

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Etude de la boucle microbienne au sein du plancton fluvial: mortalité bactérienne, grazing par le protozooplancton

Pirlot, Samuel

Award date:
2001

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA BOUCLE MICROBIENNE AU SEIN DU PLANCTON FLUVIAL :
MORTALITE BACTERIENNE, GRAZING PAR LE PROTOZOOPLANCTON**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Samuel PIRLOT

Août 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Etude de la boucle microbienne au sein du plancton fluvial :
mortalité bactérienne, grazing par le protozooplancton**

PIRLOT Samuel

Résumé

Un suivi des communautés planctoniques en Haute Meuse belge pour le site de Tailfer a été réalisé, dans le cadre d'une évaluation de l'importance de la boucle microbienne, et avec pour objectif l'étude de la mortalité bactérienne en utilisant deux techniques complémentaires. La première se base sur un suivi de la décroissance de marquage du matériel génétique bactérien préalablement marqué par de la thymidine tritiée tandis que l'autre mesure l'ingestion, par les protozoaires, de bactéries marquées fluorescentes (FLB).

Nous avons mesuré, pour la période du 7 mai au 3 juillet 2001, une production bactérienne moyenne de $0.50 \text{ g C.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ et un taux de mortalité totale moyen de $0.46 \text{ g C.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$.

D'après les activités thymidine- ^3H mesurées dans différentes fractions, ce sont les protozoaires qui, par leur pression de broutage, sont la principale cause de la mortalité bactérienne : le grazing par le microzooplancton (taille $< 63 \mu\text{m}$) a été en moyenne de $0.40 \text{ g C.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ sur la période d'étude. Par contre, le broutage par le zooplancton de taille $> 63 \mu\text{m}$ (soit des rotifères et des grands ciliés) est très faible, et la lyse bactérienne est la plupart du temps négligeable. La méthode FLB nous donne des résultats inférieurs à ceux obtenus par la méthode à la thymidine. Elle permet de constater que les nanoflagellés hétérotrophes sont les principaux consommateurs de bactéries. Les causes possibles des différences entre les deux méthodes sont discutées.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2001

Promoteur: J.-P. DESCY

Quelques mois de travail, quelques pages imprimées, quelques merci...

Je remercie le professeur J.-C. Micha de m'avoir ouvert les portes du laboratoire d'Ecologie.

Je remercie également le professeur J.-P. Descy qui a su me guider vers la rivière sans trop m'imposer le chemin.

Je remercie P. Servais pour m'avoir accueilli dans le laboratoire d'Ecologie des Systèmes Aquatiques. Ainsi que les membres du laboratoire ayant partagé leur matériel, Adri, Caro, Vincent.

Merci à Sylvie Becquevort, elle n'a pas hésité à sacrifier son temps précieux pour expliquer au béotien comment dompter ces protozoaires et leur sacré appétit.

Un autre merci pour Célia Joachim-Justo, pour tous les conseils et tous les sourires.

C'est pas un technicien, c'est McGyver ! On rajoute un McDarch et ça fait Strarsky et Hutch ! Un grand merci à Bruno et François mais aussi Laurent, Geoffroy, Yves, Clint,...

Je n'oublierai pas Simon, Stannislav, Roch, Abou, Hélène, Nico, Denis, Grand-Pas, leDuc. Cette année fut riche en cultures. Que les vents vous portent...

Moon soo, Juan-Marco, Gontran et les autres pour qui je n'ai pas été fort disponible, merci de m'avoir attendu.

Et Julie...

Enfin, sur cette air d'harmonica, je terminerai par remercier mes parents qui ont su me donner les moyens de réaliser ces études, merci.

Synthèse bibliographique	1
---------------------------------------	----------

1. Le réseau trophique pélagique.....	2
1.1. La chaîne trophique linéaire.....	2
1.2. La boucle microbienne.....	3
2. Importance de la boucle microbienne.....	6
3. Processus caractérisant la boucle microbienne.....	9
3.1. Source de matières organiques.....	9
3.1.1. Sources allochtones.....	9
3.1.2. Sources autochtones.....	10
3.2. Dynamique bactérienne.....	12
3.2.1. Assimilation du carbone.....	13
3.2.2. Production et biomasse bactérienne.....	14
3.2.3. Mortalité bactérienne.....	15
3.3. Dynamique du protozooplancton.....	18
4. Etude en milieu fluvial: cas de la Meuse.....	21
5. Objectif du mémoire.....	25

Matériel et méthodes.....	27
----------------------------------	-----------

1. localisation et caractéristiques du site étudié.....	28
2. Suivi de base.....	30
2.1. Analyses physico-chimiques.....	30
2.2. Nutriments.....	31
3. Les communautés planctoniques.....	33
3.1. Etude du phytoplancton.....	34
3.1.1. Biomasse phytoplanctonique.....	34
3.1.2. Production primaire.....	35
3.2. Etude du bactérioplancton.....	38
3.2.1. Biomasse bactérienne.....	38
3.2.2. Production bactérienne.....	40
3.2.3. Mortalité bactérienne.....	43
3.3. Etude du protozooplancton.....	46
3.3.1. Biomasse.....	46
3.3.2. Mesure de l'ingestion de bactérie par la méthode FLB.....	47
4. Mise au point méthodologique.....	49
4.1. Utilisation d'un colorant vital.....	49
4.2. Comparaison de fixateurs de protozoaires.....	50

Résultats et discussion	52
1. Analyses physico-chimiques	53
1.1. Débit et température.....	53
1.2. Oxygène dissous.....	54
1.3. pH et alcalinité.....	54
1.4. Nutriments.....	55
2. Suivi des communautés planctoniques	56
2.1. Le phytoplancton.....	56
2.1.1. Biomasse phytoplanctonique.....	56
2.1.2. Production primaire.....	57
2.2. Le bactérioplancton.....	58
2.2.1. Biomasse bactérienne.....	58
2.2.2. Production bactérienne.....	59
2.3. Le protozooplancton.....	61
2.3.1. Abondances et biomasses.....	61
2.4. Le métazooplancton.....	62
3. Mortalité bactérienne, grazing par le protozooplancton	63
3.1. Mortalité bactérienne.....	63
3.2. Activité de broutage par les protozoaires.....	66
4. Flux de carbone	71
 Conclusion et perspectives	 74
 Références bibliographiques	 78
 Annexes	 85

*SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE*

1. Le réseau trophique pélagique

1.1. La chaîne trophique linéaire

Avant les années 80, l'organisation trophique pélagique était représentée de façon linéaire selon une succession classique des producteurs primaires, consommateurs primaires, consommateurs secondaires, ... Ainsi, d'une manière générale, le phytoplancton occupe le niveau des producteurs primaires, assimilant le carbone inorganique du milieu en utilisant la lumière comme source d'énergie grâce à la photosynthèse. Le phytoplancton est ensuite dévoré par le zooplancton herbivore: les consommateurs primaires qui seront à leur tour consommés par le zooplancton carnivore. Voici donc la chaîne trophique planctonique classique (fig. 1).

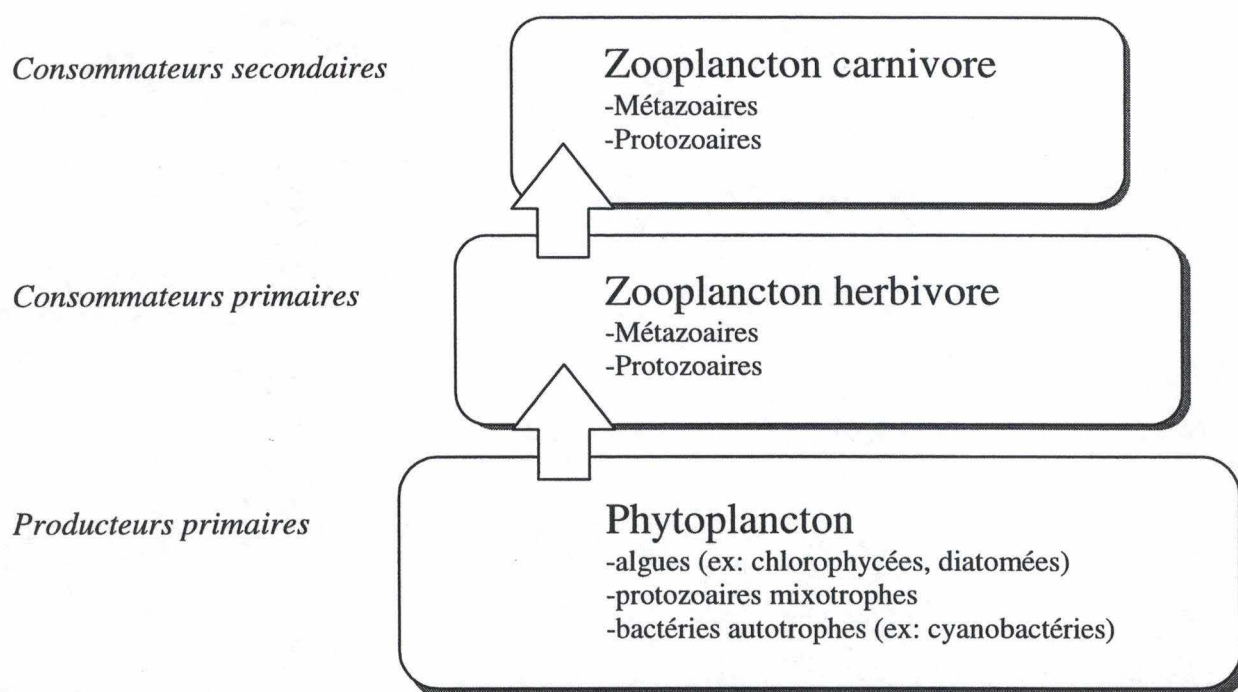


Fig. 1: Schéma de la chaîne trophique classique.

Cette organisation simple était admise pour tous les milieux aquatiques de type pélagique, aussi bien en milieu marin qu'en milieu lacustre ou pour les grandes rivières.

A cette époque, on considérait le bactérioplancton comme ayant une influence mineure sur le reste du réseau trophique planctonique (STEELE 1974), les bactéries n'intervenant que dans le recyclage des nutriments. De plus, il y avait systématiquement une sous-estimation du bactérioplancton, conséquence des techniques d'évaluation des populations bactériennes dont les résultats étaient toujours inférieurs à la réalité.

Néanmoins, en milieu marin, plus qu'en eau douce, on soupçonnait déjà l'importance des reminéralisateurs pour la décomposition des matières organiques et le recyclage des nutriments, primordial en mer car les apports allochtones en nutriments inorganiques, indispensables pour les producteurs primaires, sont souvent proportionnellement faibles par rapport aux volumes concernés, contrairement aux milieux lacustres et aux rivières.

1.2. La boucle microbienne

Avec l'introduction des techniques de dénombrement direct des bactéries par microscopie à épifluorescence (PORTER et FEIG, 1980) et aussi grâce au développement de méthodes immunologiques liées à l'utilisation d'anticorps monoclonaux, on a pu révéler des densités bactériennes (10^5 à 10^7 cell./ml) nettement supérieures aux résultats obtenus sur cultures de bactéries en milieux gélosés et après incubation à des températures élevées (technique CFU, cfr. Page 14).

Aussi, l'utilisation, en microscopie à épifluorescence, de fluorochromes spécifiques des protéines ou des acides nucléiques a également permis de mettre en évidence la présence d'une abondante communauté de protistes flagellés hétérotrophes (10^2 à 10^5 cell./ml), alors que ces types de protozoaires sont les principaux prédateurs des bactéries (CARON, 1983).

Dès lors, les proportions de biomasse attribuées aux différents hétérotrophes de la chaîne trophique durent être revues pour rendre aux bactéries la part importante qui leurs revenait. Cette biomasse importante étant distribuée dans un grand nombre d'individus de petite taille, on s'est vite rendu compte que les bactéries avaient une surface réactive plus importante que le reste de la communauté planctonique (WILLIAMS, 1981). Il fallait donc revoir la structure de la chaîne trophique classique.

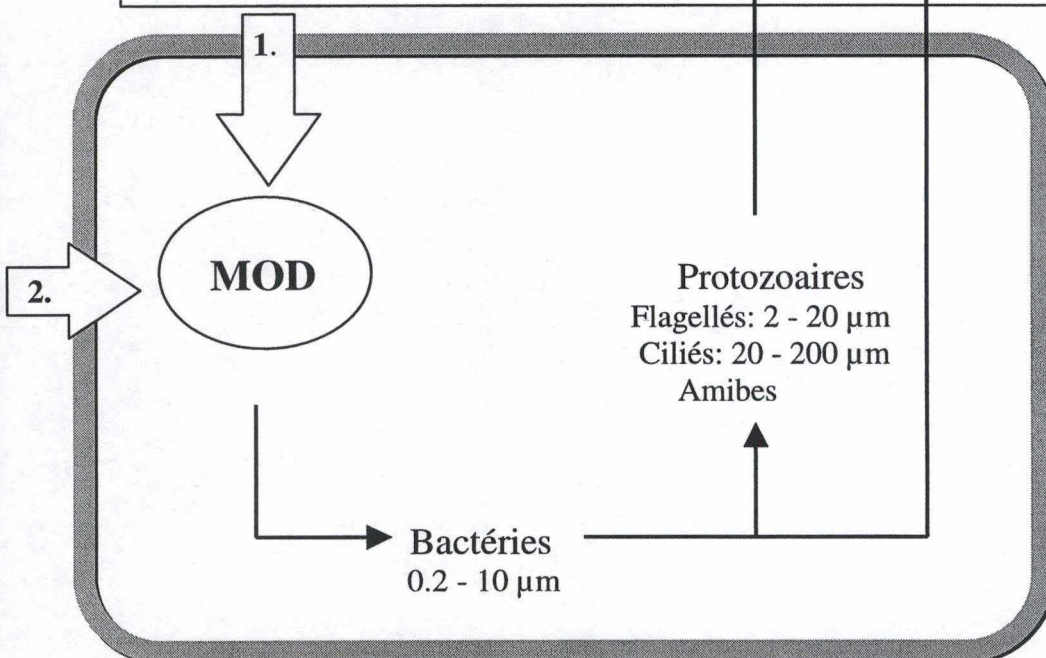
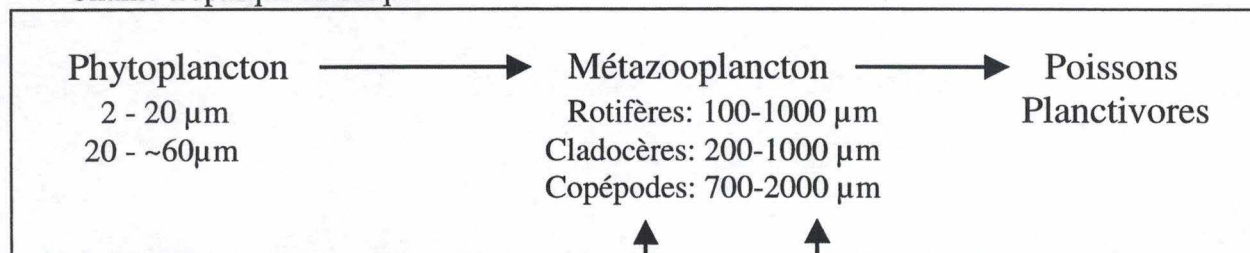
Et en 1983, Azam *et al.* introduisent le concept de boucle microbienne. Désormais, les bactéries jouent un double rôle: en plus de reminéralisateurs, les bactéries sont des producteurs de biomasse disponible pour les niveaux trophiques supérieurs.

La production bactérienne peut atteindre 20 % de la production primaire, soit le double de la production du macrozooplancton (COLE *et al.*, 1988). Cette production bactérienne repose sur les apports en matières organiques dissoutes assimilable par les bactéries, essentiellement produite par les autotrophes photosynthétiques au cours de leur vie (excrétion) ou lors de la mort cellulaire (lyse).

En zone pélagique, si les apports allochtones de matières organiques sont faibles, l'activité bactérienne se couple avec la production extracellulaire algale au printemps. En été, les stocks de matières organiques évoluent vers une diversification de l'origine de ces molécules car s'additionnent à la production algale, la lyse cellulaire algale, l'excrétion zooplanctonique et le sloppy feeding (décharge de matières organiques dissoutes lors de l'ingestion d'algues par le zooplancton).

En milieu marin, la complexification des molécules organiques se produit beaucoup plus tôt, dès le printemps. Aussi, si une pollution organique se produit, les apports de MO biodégradable vont favoriser la production bactérienne (HESSEN 1985, TRANSVIK 1989, SUNDH & BELL 1992). L'importance de la boucle microbienne peut donc varier fort en fonction du milieu.

Chaîne trophique classique



Boucle Microbienne

1. Excrétion, lyse, sloppy feeding
2. Apports allochtones

Fig. 2: Schématisation de la boucle microbienne.

Relations trophiques entre les divers constituants du plancton.

Rem: Il existe aussi des interactions au sein d'un même niveau trophique (ex: cannibalisme, prédation...).

La MOD: Matière Organique Dissoute est aussi alimentée par la lyse cellulaire de tous les organismes planctoniques.

Les bactéries entrent en compétition avec les producteurs primaires pour certains nutriments inorganiques comme les orthophosphates mais d'un autre côté entraînent un apport de nutriments pour le phytoplancton grâce à la minéralisation des matières organiques (WETZEL, 1983).

Les bactéries alimentent les nanoflagellés hétérotrophes, les ciliés et même le métazooplancton, ceux-ci consommés par des prédateurs vertébrés ou invertébrés du niveau trophique supérieur. Les liens trophiques se multiplient avec une augmentation des pertes entre deux niveaux trophique par la respiration. D'un autre côté, la consommation des bactéries par le proto- et le métazooplancton permet une restitution du COD (Carbone Organique Dissous) que l'on croyait perdu pour la chaîne trophique (SHERR *et al.* 1987).

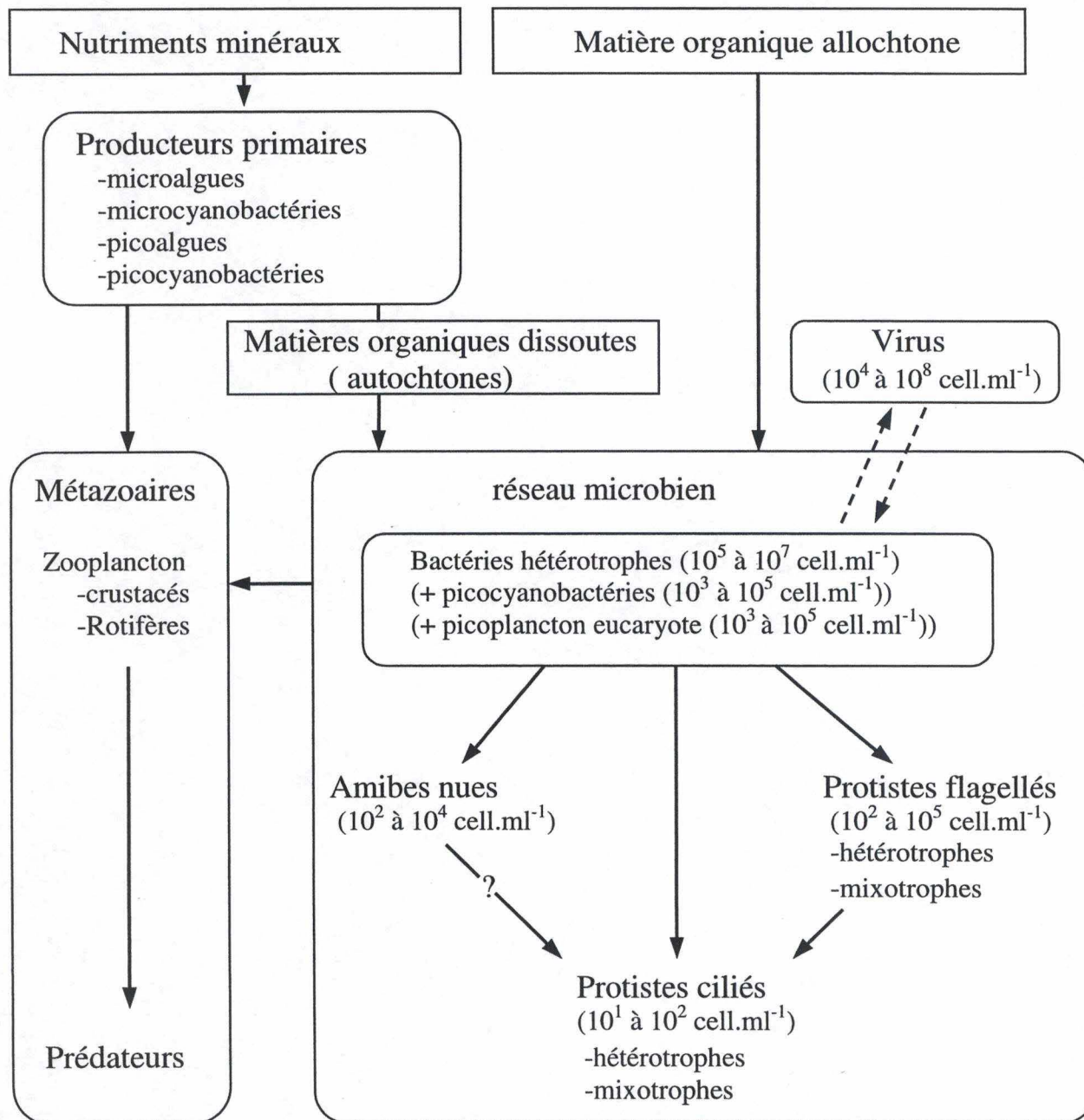


Fig. 3 : Schématisation des réseaux trophiques en milieu aquatique pélagique et variations de l'abondance des différentes communautés de la boucle microbienne selon le niveau trophique des milieux (AMBLARD *et al.* 1998).

Avec la boucle microbienne, les interactions entre les différents niveaux trophiques se multiplient, on ne parlera plus de chaîne trophique mais bien de réseau trophique, lui-même constitué d'un réseau microbien.

Le terme de réseau trophique microbien s'emploiera à partir du moment où l'on considère qu'une part de la production primaire est consommée par les protozoaires.

De nombreuses études sur la boucle microbienne ont été réalisées, notamment ces quinze dernières années, grâce aux progrès techniques effectués en écologie microbienne. Cependant, ces travaux s'appliquent essentiellement sur les boucles microbiennes des milieux marins et des milieux lacustres, peu sur les milieux fluviaux.

2. Importance de la boucle microbienne

Une classification des différents milieux pélagiques selon les caractéristiques de leur boucle microbienne serait risquée car la boucle subit aussi l'influence de facteurs externes tel que les conditions climatiques, hydrologiques, ... Il faut donc étudier la boucle microbienne de chaque site comme un cas particulier selon sa localisation. L'importance de la boucle microbienne dépend en fait de deux paramètres : les apports et les différents acteurs de cette boucle microbienne variables en fonction du milieu.

Les recherches d'AZAM *et al.* (1983) en milieu marin montrent que la production bactérienne, dépendante des apports en carbone et nutriments, peut être inhibée par une limitation de ces ressources. Beaucoup de matières organiques dissoutes (MOD) sont produites par les autres niveaux trophiques et lors des blooms phytoplanctoniques mais les nutriments limitent parfois la réponse des bactéries aux apports et on assiste alors à une accumulation transitoire de ces MOD. Cependant, les bactéries avec leur rapport surface/volume élevé sont capables d'assimiler les nutriments même lorsque les concentrations sont faibles dans le milieu.

AZAM *et al.* a pu mettre en évidence une relation entre la biomasse bactérienne et la production primaire se traduisant par un couplage entre la production phytoplanctonique et la production bactérienne.

Les bactéries utilisent la MOD fournie par le phytoplancton. Il existe d'ailleurs une synchronisation nycthémérale du taux de croissance bactérien avec la production de MOD. En outre, les bactéries peuvent aussi se mouvoir jusqu'à 10 μm , répulsées par une cellule algale saine, sans doute à cause d'antibiotiques naturellement synthétisés par l'algue. Sinon elles s'attachent aux cellules algales moribondes (AZAM *et al.*, 1983; HORNE & GOLDMAN, 1994). Certains chercheurs (BRATBAK & THINGSTAD 1985, BJØRNSSEN 1988) souligneront le paradoxe de la stimulation des productions bactériennes par le phytoplancton alors qu'ils sont en compétition pour les nutriments, une sorte de commensalisme de la part des bactéries.

Si les populations bactériennes ne sont pas limitées par leurs besoins nutritionnels, comment s'effectue la régulation des populations ?

Il existe aussi une relation entre les populations bactériennes et celles de nanoflagellés hétérotrophes. Cette relation est de type proie-prédateur, c'est-à-dire que les nanoflagellés présentent un pic d'abondance légèrement décalé par rapport au pic de bactéries, la croissance des nanoflagellés répondant à l'abondance de nourriture (Fig. 4).

Le rôle de régulation des populations bactériennes est donc tenu, principalement, par les organismes bactérovores. Ce sont les nanoflagellés hétérotrophes (HNF) qui sont les principaux prédateurs (GÜDE, 1988). Leur taille peut atteindre 10-20 μm à des concentrations de 10^2 à 10^5 ind./ml. Ceux-ci sont capables d'ingérer des particules de 1 μm , voir plus.

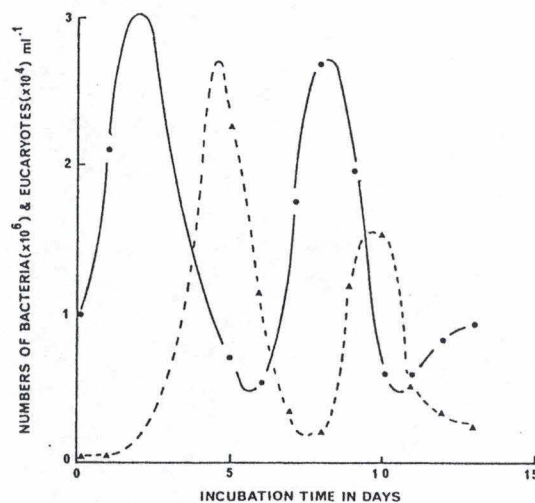


Fig. 4: relation proie-prédateur entre les bactéries (—) et les petits eucaryotes de 3-10 μm (essentiellement des nanoflagellés hétérotrophes(---)). Incubation à 15°C, à l'obscurité (AZAM *et al.* 1983).

La prédation sur les bactéries n'est pas l'exclusivité des nanoflagellés hétérotrophes. Des flagellés mixotrophes (PORTER, 1988), ainsi que d'autres protozoaires, les ciliés (CARRIAS *et al.* 1996), mais aussi des métazoaires, notamment les cladocères (JÜRGENS, 1994) et les rotifères (OOMS-WILMS, 1997) se nourrissent également de bactéries.

La présence et l'abondance de ces prédateurs dépend du type de milieu et de la saison. Certains facteurs physico-chimiques, comme la température et le débit des eaux ont une influence majeure sur la composition et l'abondance des communautés planctoniques.

Comme en milieu marin, l'étude des milieux lacustres nous révèle généralement un couplage entre la production primaire et la production bactérienne (COLE *et al.* 1988) :

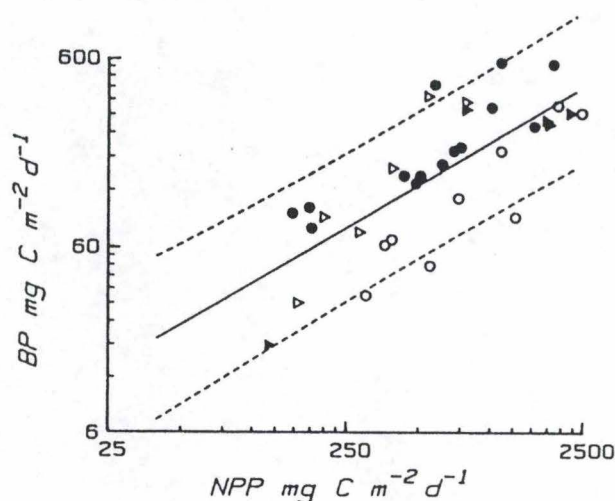


Fig. 5: Corrélation entre la production primaire (NPP) et la production bactérienne (PB). Régression: $\text{Log } Y = 0.75 \text{ Log } X + 0.093$. Les points blancs pour le milieu marin, les points noirs pour l'eau douce (COLE *et al.* 1988).

En milieu aquatique, on distingue souvent les milieux en fonction de leurs concentrations en nutriments. Les milieux oligotrophes, caractérisés par une eau claire, oxygénée, pauvre en nutriments et donc "pauvre" en organismes et les milieux eutrophes, riches en nutriments inorganiques, présentant généralement de grandes biomasses planctoniques, parfois au détriment de la biodiversité, certaines espèces pouvant prendre le dessus sur d'autres.

En milieu oligotrophe, l'excrétion phytoplanctonique est importante (LANCELOT, 1983) et stimule la production bactérienne. De plus, ce genre de milieu favorise les organismes de petite taille dont le rapport surface/volume est élevé. Cette production diminue encore plus la disponibilité des nutriments pour le phytoplancton. Heureusement, le broutage des bactéries par les protozoaires permet de récupérer les MO et les nutriments; la boucle joue donc un rôle stabilisateur (STONE, 1990). L'importance de cette boucle microbienne confère aux milieux oligotrophes une grande capacité de reminéralisation.

En milieu eutrophe, c'est plutôt la chaîne trophique classique qui est dominante. Avec de fortes biomasses phytoplanctoniques favorisant le macrozooplancton, la boucle microbienne n'intervient que pour optimiser la biosynthèse en récupérant les MOD provenant des rejets métaboliques des autres niveaux du réseau trophique. Le métazooplancton bactériophage, court-circuitant la boucle, permet aussi de réduire le nombre de niveaux trophiques et donc les pertes par respiration.

Ces quelques pages ne constituent pas un résumé de la boucle microbienne, plusieurs ouvrages pourraient y être consacrés tant les interactions et les particularités contextuelles y sont nombreuses. Tout au plus, il s'agit d'une introduction à la boucle microbienne indispensable avant de s'atteler à l'étude des interactions entre bactéries et protozoaires en milieu fluvial.

3. Processus caractérisant la boucle microbienne

3.1. Sources de Matières Organiques (MO)

L'origine de la matière organique dans le réseau hydrographique peut être autochtone et allochtone. Les apports autochtones proviennent de la production primaire, les apports allochtones peuvent provenir des effluents domestiques, industriels, agricoles et des apports de type humique provenant du lessivage des sols.

3.1.1. Sources allochtones

On peut distinguer deux types de sources de matières organiques. Les sources ponctuelles présentant l'avantage d'être plus facilement mesurables et maîtrisables. Les sources diffuses, elles, sont moins facilement estimables mais peut-être, parfois plus régulières.

Les rejets domestiques sont de type ponctuels, on peut les évaluer en fonction du nombre d'habitants vivant sur le bassin versant de la rivière et en définissant une valeur de l'"équivalent-habitant" correspondant à la charge quotidiennement rejetée par habitant. On tiendra compte aussi de l'épuration tertiaire si elle existe.

Il y a les rejets industriels et agricoles, ces derniers peuvent être important surtout dans les élevages intensifs bien que les rejets directs des élevages restent difficiles à évaluer de part la sporadicité du phénomène.

Enfin, le lessivage des sols provoque des apports diffus de matières organiques. Les matières humiques des sols proviennent de la dégradation plus ou moins avancée de matières organiques formant ainsi l'humus. Ces MO peuvent être extraites en milieu alcalin. Lorsque l'eau percole dans les sols, elle draine ces matières humiques et se charge donc de matières organiques. Celles-ci sont cependant "réfractaires", c.à d. peu biodégradables.

Un outil informatique, PEGASE, permettant de modéliser les apports de matières organiques allochtones nous renseigne une valeur moyenne de $0,375 \text{ g C. m}^{-2}.\text{j}^{-1}$.

En termes de biodégradabilité, on peut diviser les apports totaux (autochtones et allochtones) de MO en trois fractions : la première, 14 à 15% pourra être assimilée de suite par les bactéries. Par contre, une deuxième fraction doit d'abord subir une hydrolyse exoenzymatique pour être dégradée en plus petites molécules que des perméases spécifiques pourront faire passer à travers la membrane de la bactérie. Ce mécanisme permet de rendre en moyenne 55% de la MOD assimilable par les bactéries hétérotrophes. La troisième fraction n'est pas biodégradable.

3.1.2. Sources autochtones

Les mécanismes de passage de matières organiques du phytoplancton aux bactéries sont multiples, outre l'attaque microbienne, on peut citer l'excrétion phytoplanctonique, la lyse cellulaire et le "sloppy feeding".

L'excrétion phytoplanctonique est un processus tout à fait normal du métabolisme des producteurs primaires (SELL & OVERBECK, 1992). Les cellules peuvent excréter des molécules de faible poids moléculaire mais aussi des molécules plus complexes lorsque les algues doivent libérer des excès d'énergie.

Beaucoup de facteurs peuvent faire varier le taux d'excrétion mais d'une manière générale, on considère un taux d'excrétion moyen stable dans un milieu déterminé.

Le taux d'excrétion varie en fonction de:

- l'espèce, qui possède un taux d'excrétion propre (HELLEBUST, 1965).
- l'âge de la cellule, car avec le vieillissement, les membranes deviennent plus poreuses et donc facilitent le passage des molécules (SELL & OVERBECK, 1992).
- une limitation en nutriments (milieu oligotrophe), qui engendre une excrétion plus élevée (LANCELOT, 1983).
- un rayonnement lumineux trop important favorise l'excrétion par le phénomène de photorespiration, mécanisme d'évacuation des excès d'énergie chez les autotrophes.
- la turbulence des eaux réduit la couche limite de diffusion des cellules algales, favorisant ainsi la libération des produits de la photosynthèse (KÖHLER, 1997).

Lors de la mort de la cellule algale, il y a aussi libération de matières organiques. Cette mort peut être naturelle, mais aussi provoquée par des virus ou par des champignons parasites (Chytridiomycètes ou Oomycètes). La prédation par le métazooplancton peut aussi entraîner des pertes de matières organiques (sloppy feeding) lors de l'ingestion des algues.

Le sujet est d'actualité, on peut d'ailleurs trouver de nombreux travaux dans la dernière décennie, traitant des relations entre la production phytoplanctonique et la production bactérienne, via l'excrétion ou la lyse algale (AGUSTI *et al.*, 1998; AGUSTI & DUARTE, 2000).

Parmi tous les apports possibles de MO, les apports par le phytoplancton sont les plus biodégradables, les plus rapidement assimilables. C'est donc cette source qui reste la plus importante en Haute Meuse belge où les apports de carbone autochtone par la production primaire domine les apports externes de matières organiques (SERVAIS *et al.* 2000). D'ailleurs, on peut observer une relation entre réassimilation bactérienne et production primaire (FRANCOIS, 2000; DESCY *et al.*, sous presse).

On constate en effet, dans un fleuve eutrophe comme la Meuse, un couplage entre production phytoplanctonique et production bactérienne (SERVAIS, 1989; SERVAIS *et al.*, 2000). La façon dont ce couplage s'établit est encore à l'étude: quoi qu'il en soit, on sait déjà que l'excrétion de MO par le phytoplancton (EOC), qui est étroitement dépendante du taux de production primaire, est un processus significatif. Les bactéries assimilent la plus grande partie de carbone excrété par les algues, ce qui explique la relation entre réassimilation bactérienne et production primaire.

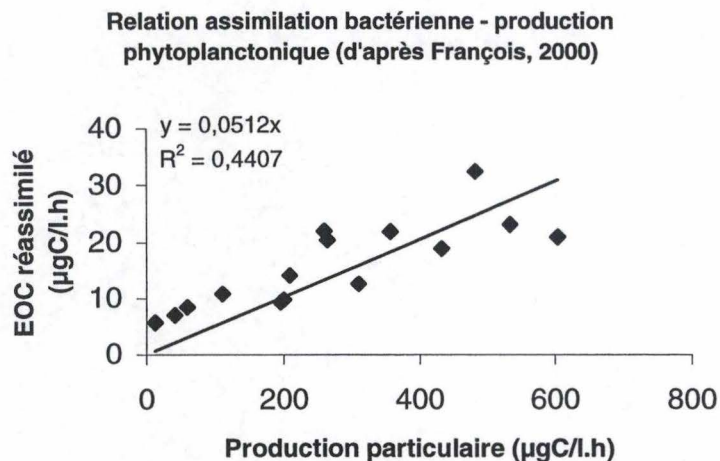


Fig. 6: Relation entre la réassimilation bactérienne (EOC = Carbone organique excrété) et la production primaire phytoplanctonique (production particulaire) dans la Meuse (Tailfer) en 2000, tout deux exprimés en $\mu\text{g C.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$. (d'après FRANCOIS, 2000).

3.2. Dynamique bactérienne

Dans le réseau microbien, les bactéries occupent une place centrale de par leur fonction. Mais cela ne concerne pas toutes les bactéries présentes dans le milieu. Il ne faut prendre en considération que les bactéries assimilant la matière organique dissoute et dont le métabolisme se base sur la respiration. Autrement dit, on ne tient compte que des bactéries chémohétérotrophes. Les cyanobactéries, par exemple, sont considérées comme producteurs primaires.

Un grand intérêt est porté à l'étude des bactéries chémohétérotrophes en rivière car la dégradation de la matière organique peut engendrer des problèmes de désoxygénation. Ces bactéries jouent donc un rôle très important dans les processus d'eutrophisation survenant lors de pollutions organiques et suite à des apports de nutriments par les eaux usées ou les apports agricoles.

3.2.1. Assimilation du carbone

Nous l'avons vu, une partie de la MO doit d'abord subir une étape de transformation avant d'être utilisable par les bactéries : une hydrolyse exoenzymatique. Les premières exoenzymes découvertes étaient des exoprotéases et des exoglucosidases, par la suite, d'autres types d'exoenzymes furent déterminées. SOMVILLE & BILLEN (1983), pour les exoprotéases et SOMVILLE (1984), pour les exoglucosidases ont développé les méthodes pour mesurer cette activité exoenzymatique. Le principe de celles-ci repose sur l'hydrolyse de substrats dont les produits sont des chromophores fluorescents.

L'activité exoenzymatique constitue l'étape limitante d'ingestion de matières organiques. Les enzymes intervenants dans l'hydrolyse des MO répondent, en effet, à une cinétique d'action de type Michaelis-Menten. C'est la saturation de la vitesse d'hydrolyse (V_{max}) des exoenzymes qui limite l'ingestion de la matière organique par les bactéries.

Une activité organotrophe se définit comme l'utilisation de substrats directs (produits de l'hydrolyse exoenzymatique) par les bactéries. Ces substrats servent pour produire de la biomasse, via la production bactérienne, ou pour satisfaire les besoins énergétiques de la cellule. Les substrats sont alors oxydés en dioxyde de carbone par la respiration bactérienne, ceci constituant le processus de reminéralisation de la matière organique.

Pour mesurer cette activité organotrophe, il existe différentes méthodes. En milieu aérobie, on peut mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène dans un échantillon. Les défauts de cette méthode sont la faible sensibilité, la non-spécificité aux bactéries et surtout l'incapacité d'appliquer cette méthode aux milieux anaérobies.

Une autre méthode repose sur le fait que, chez les bactéries hétérotrophes, il existe quand même une faible incorporation de CO_2 par diverses voies enzymatiques (WOOD & UTTER, 1965 in SERVAIS, 1987). Ces voies dites "anaplérotiques" permettent la synthèse, par carboxylation, de certains intermédiaires liés aux fonction biosynthétiques du cycle de Krebs. En utilisant du bicarbonate radioactif (^{14}C) à l'obscurité pour supprimer l'activité des autotrophes, et en connaissant le pourcentage d'incorporation de CO_2 , on peut calculer. Cependant, SOROKIN, en 1965 (in SERVAIS, 1987), a montré que le rapport CO_2 / matières organiques totales pouvait varier de 1.5 à 8% selon l'espèce et le substrat utilisé. Par ailleurs MORRIS *et al.* (1971) démontrent qu'il y a même, à l'obscurité, aussi une incorporation du bicarbonate par les organismes autotrophes.

Les méthodes récentes se basent désormais sur le marquage isotopique de différents stocks de substrats directs qui permet une mesure sensible de l'assimilation ("uptake") par les bactéries hétérotrophes et de leur respiration.

3.2.2. Production et biomasse bactérienne

L'assimilation de MO permet aux bactéries d'accroître leur biomasse grâce à la production bactérienne :

$$P = \mu \times B$$

- Où
- P = Production bactérienne ($\mu\text{gC.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
 - μ = Taux de croissance (h^{-1}).
 - B = Biomasse bactérienne ($\mu\text{gC.l}^{-1}$).

On peut mesurer cette productivité à partir du taux de synthèse de l'ADN bactérien (FUHRMAN et AZAM, 1980, 1982). La synthèse d'ADN est directement proportionnelle au taux de division cellulaire des bactéries. Une incubation en présence d'un nucléoside radioactif nous fournira une vitesse d'incorporation correspondant donc à une production bactérienne.

Pendant longtemps, pour estimer la biomasse, les méthodes CFU (Colony Forming Units), basées sur une mise en culture d'une souche sur milieu gélosé, sous-estimaient systématiquement les biomasses bactériennes. Des problèmes d'agrégation de bactéries s'ajoutaient au fait que, d'une part, les milieux de culture et les températures d'incubation étaient trop sélectifs pour permettre la croissance de toutes les espèces vivantes dans le milieu; d'autre part, que les paramètres idéaux (T° , temps d'incubation, ...) n'étaient pas vraiment connus, chacun y allant ainsi de sa propre petite recette, on se retrouvait avec des problèmes de reproductibilité.

Des méthodes chimiques furent inventées pour pallier ces problèmes. L'une proposait un dosage de l'ATP (HODSON *et al.* 1976), mais n'était pas spécifique aux procaryotes alors il fallait d'abord séparer les organismes selon leur taille pour sélectionner les petits procaryotes. AZAM et FUHRMAN (1984 in SERVAIS, 1987) montreront que la filtration entraîne une modification du pool d'ATP. De plus, on s'apercevra vite que le rapport entre l'ATP et le carbone organique cellulaire peut varier fort, notamment en fonction de l'état physiologique de la population bactérienne (WATSON *et al.*, 1977). MORIARTY en 1975, propose le dosage de l'acide muramique, mais la quantité d'acide muramique varie en fonction de la surface de la paroi bactérienne et de l'épaisseur de la couche de peptidoglycane des parois, plus importante et plus variable chez les bactéries gram-positives.

WATSON et al. (1977) a aussi proposé un dosage des lipopolysaccharides (L.P.S.). Cette technique n'est cependant utilisable que pour les bactéries gram-négatives car les gram-positives ne possèdent pas de complexe lipopolysaccharidique.

Les progrès de la microscopie ont permis d'avancer réellement dans l'évaluation des biomasses bactériennes. Les microscopes électroniques à balayage et à transmission, avec la microscopie à épifluorescence permettent les premiers comptages réels. Cette dernière technique, basée sur l'observation de bactéries marquées par un colorant fluorescent, ayant l'avantage de permettre la distinction entre des bactéries et des particules de taille semblable.

Aujourd'hui, les comptages s'automatisent grâce aux systèmes informatiques analyseurs d'images, ou encore grâce à la technique de cytométrie en flux (CMF). Ces deux techniques restent néanmoins basées sur la détection, jusqu'à une quantification de la fluorescence induite chez des bactéries. Plus que de simples techniques de comptages, par l'intégration très rapide de différents paramètres cellulaires physiques et biologiques, elles deviennent des méthodes exceptionnelles d'étude de la cellule bactérienne *in situ* dans les écosystèmes aquatiques (Monfort *et al.* 1995).

On peut aussi utiliser des sondes oligonucléotidiques (16 à 22 nucléotides) fluorescentes. Ce nouvel outil moléculaire permet, après hybridation *in situ*, de reconnaître des séquences d'acides nucléiques spécifiques, comme les séquences de l'ARN ribosomal. Cette technique, couplée aux techniques de cytométrie, offre, entre autre, des applications en écologie bactérienne pour les études phylogénétiques et les mesures de l'activité métabolique.

3.2.3. Mortalité bactérienne

Il faut d'abord s'entendre sur le terme mortalité appliqué à des bactéries. Ce sont des organismes procaryotiques qui se divisent par scissiparité et transmettent ainsi leur information génétique à deux cellules filles. D'un certain point de vue, on peut considérer les bactéries comme des organismes immortels... Dans les travaux récents, on considère la mortalité comme le processus de perte d'intégrité fonctionnelle et morphologique des bactéries incluant la lyse cellulaire et la destruction du matériel génétique (SERVAIS, 1987). Mais cela n'a pas toujours été le cas...

Au fil des années, le concept de mortalité a évolué avec les techniques disponibles et les problèmes pratiques induits par l'étude du sujet (SERVAIS *et al.* 1992).

POSTGATE *et al.* (1961 in SERVAIS, 1992) et POSTGATE et HUNTER (1962 in SERVAIS, 1992) s'accordent à définir la bactérie vivante comme celle qui peut former une colonie en se multipliant dans un milieu supposé optimum. On fait donc le rapport entre les bactéries capables de se multiplier et le nombre total de bactéries, en laissant pour morts des organismes conservant leur morphologie et même certaines fonctions biologiques. POSTGATE, en 1977 (in SERVAIS, 1992), reconnaîtra lui-même que ses bactéries ne sont pas plus mortes qu'une femme ménopausée...

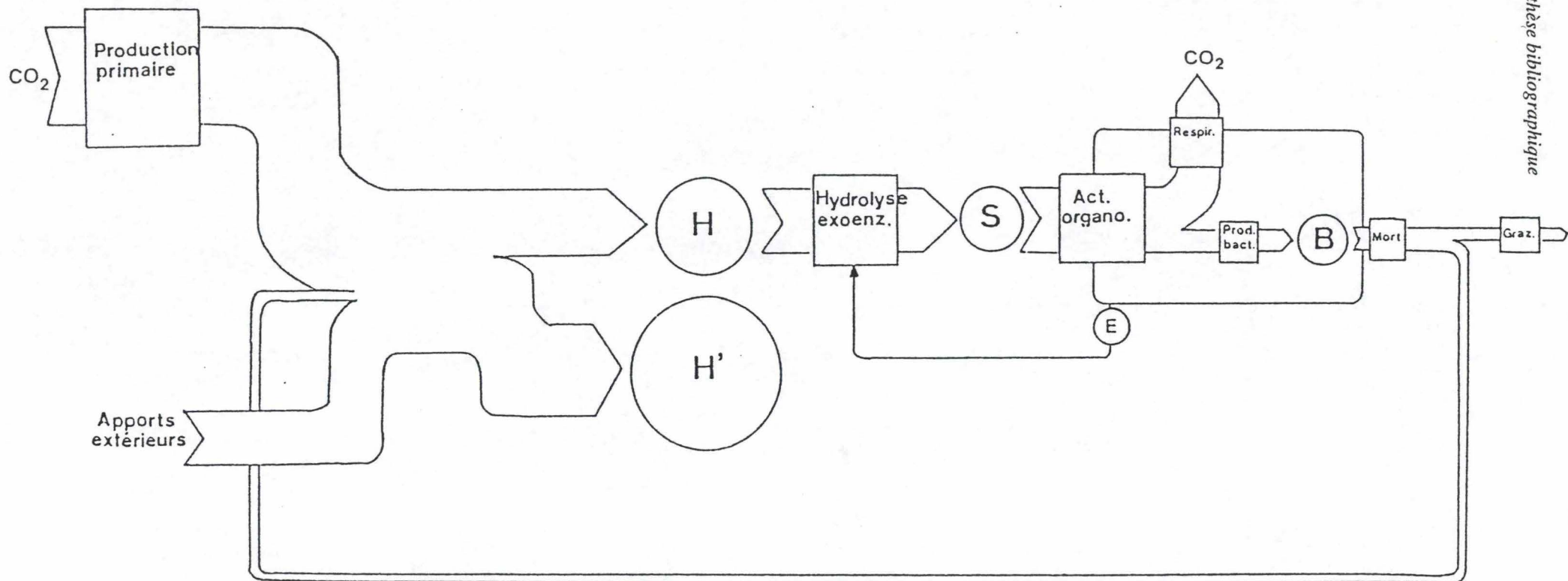
En outre, GRAY en 1977 (in SERVAIS, 1992), soulignera qu'un milieu de culture unique ne permet pas la croissance de l'ensemble des espèces du milieu naturel. Enfin, ce concept de perte de viabilité ne représente pas le flux de production de détritus causé par la mort alors que se sont justement ces détritus qui sont important d'un point de vue biogéochimique.

En 1987, ROSZAK & COLWELL (in SERVAIS, 1992) développent le concept d'organisme viable mais non cultivable pour définir la mort comme une perte de l'intégrité cellulaire. Et puis, récemment, avec la découverte que du matériel génétique bactérien extracellulaire pouvait être transmis dans d'autres bactéries, on a recentré le concept de mortalité sur la macromolécule d'ADN, avec une définition plus fondamentale reposant sur la destruction du matériel génétique.

Pour l'étude de la mortalité bactérienne en Meuse réalisée cette année, on utilisera la technique développée par SERVAIS *et al.* en 1985. Cette technique est basée sur un suivi de la décroissance du marquage des bactéries préalablement incubées en présence d'un substrat marqué, en l'occurrence, de la ^3H -Thymidine (cfr. Matériel et méthodes). Cette technique présente le gros avantage de permettre un suivi de la mortalité sur une population bactérienne en condition de croissance.

En outre, cette technique permet de différencier la mortalité due à l'autolyse, la mort naturelle et la mortalité due au grazing par le zooplancton bactérivore, catégorie d'organismes principalement représentée par les protozoaires.

Finalement, SERVAIS, en 1987, a proposé une modélisation de ce compartiment microbien au sein du réseau trophique pélagique (cfr page suivante). L'évolution des connaissances en écologie microbienne de l'époque permettait dès lors de concevoir un modèle résumant ces interactions entre la matière organique et les bactéries qui la dégradent :



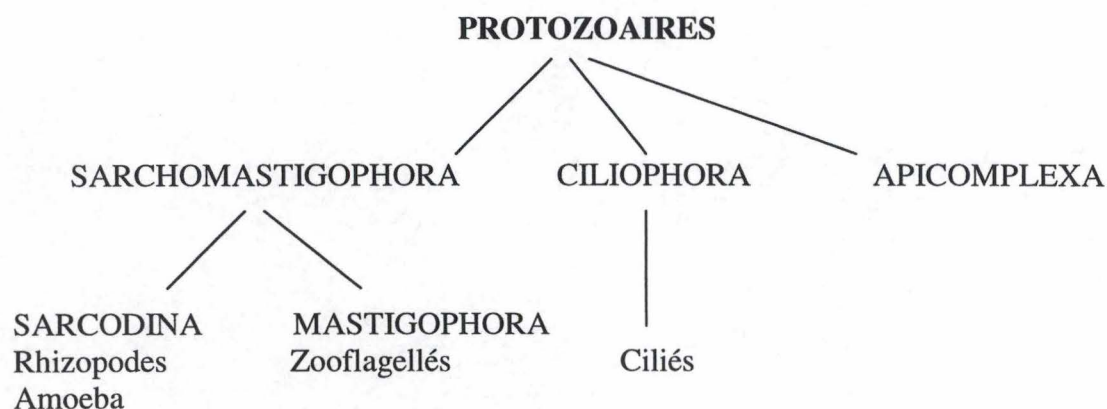
Représentation schématique des processus élémentaires impliqués dans la dégradation de la matière organique par les bactéries en milieu aquatique. Il représente le stock de matière organique biodégradable, H' celui de matière organique non biodégradable, S représente le pool de substrats directs, B , la biomasse bactérienne et E , les exoenzymes bactériens.

Fig. 7:
(SERVAIS, 1987).

3.3. Dynamique du protozooplancton

Voici le nom que l'on donne aux organismes protozoaires constitutifs du plancton : protozooplancton. Peu de données existent sur ces protistes, sans doute à cause de leur petite taille et de la diversité énorme des organismes unicellulaires présents dans les différents milieux aquatiques. Les interactions entre bactéries et protozooplancton constituent pourtant le principal mécanisme de régulation des populations bactériennes dans la boucle microbienne.

En Meuse, on retrouve essentiellement des amibes, des ciliés et des flagellés. Sans entrer dans les détails, on peut présenter une classification simplifiée de ces différents protozoaires:



Les amibes ou sarcodines (Fig. 8) sont les plus difficiles à déterminer car en plus d'un grand nombre d'espèces. Leur forme peut varier fort au sein d'une même espèce principalement à cause de leur moyen de déplacement. Les amibes, pour se mouvoir, peuvent en effet étirer des pseudopodes modifiant ainsi la forme générale de la cellule. Ces pseudopodes servent aussi pour encercler leur proie.

Les amibes ingèrent bien des bactéries cependant, la faible représentation de ces organismes en Meuse, par rapport au reste de la communauté de protozoaires permet sans doute de négliger leur influence sur la boucle microbienne.

Les ciliés sont les plus grands des protozoaires, leur taille peut aller jusqu'à 200 μm . Ils se nourrissent de bactéries, du petit phytoplancton mais aussi des petits protozoaires, généralement les flagellés. Au sein des ciliés, une distinction peut se faire suivant la répartition des cils, on les divise alors en Holotriches, Péritriches et Spirotriches (Fig. 9).

La vitesse d'ingestion des ciliés est généralement de l'ordre de la centaine de bactéries ingérées par individu et par heure, cela dépendant de l'espèce et des conditions du milieu; les flagellés, eux, se contentent plutôt de quelques bactéries par individu et par heure. Néanmoins, les ciliés exercent moins d'influence sur les populations bactériennes que les flagellés du fait de leur faible densité par rapport aux flagellés beaucoup plus nombreux (MENON *et al.* 1996).

Les flagellés sont donc les principaux acteurs dans la prédation des bactéries. On peut séparer les flagellés en deux populations distinctes: les dinoflagellés et les nanoflagellés hétérotrophes (HNF). Les dinoflagellés (phylum des *Dinoflagellata*) se caractérisent par leur dinocaryon, appareil nucléaire spécial. Le corps est recouvert de plaques corticales avec deux flagelles situés dans deux sillons, l'un transversal et l'autre longitudinal. Les HNF sont plus petits que les dinoflagellés et n'ont pas de caractéristique spéciale, il se constituent d'une cellule plus ou moins sphérique et un ou deux flagelles pas toujours visibles. Les HNF présentent des densités souvent très élevées par rapport à tous les autres protozoaires.

Nous ne nous aventurerons pas plus loin dans la systématique des protozoaires, le but de ce travail n'étant pas taxinomique. On se limitera, lors de l'examen microscopique, à faire la différence au sein des bactérovores entre amibes, ciliés et flagellés, car le travail nous focalise sur l'étude des flux de carbone transitant depuis les bactéries jusqu'au métazooplancton.

Remarquons au passage que les bactérovores ne sont pas toujours hétérotrophes stricts. En effet, certains organismes se nourrissent de bactéries mais peuvent présenter aussi une activité photosynthétique lorsque les proies se font plus rares, cette capacité peut leur permettre de dominer les populations de protozoaires dans des conditions où les hétérotrophes stricts sont limités dans leur nutrition. En 1996 (SERVAIS *et al.*, 2000), les protozoaires étaient représentés en moyenne par 78 % (en biomasse) de mixotrophes (Fig. 10). Nous devons donc aussi faire la distinction entre les organismes hétérotrophes et mixotrophes en tenant compte, en microscopie à épifluorescence, des pigments photosynthétiques qui fluorescent à des longueurs d'ondes déterminées (cfr. matériel et méthodes).

Il faudra surtout s'intéresser aux dynamiques des différentes populations et chercher les éventuelles corrélations existant entre les différents niveaux trophiques via l'observation des fluctuations annuelles de populations.

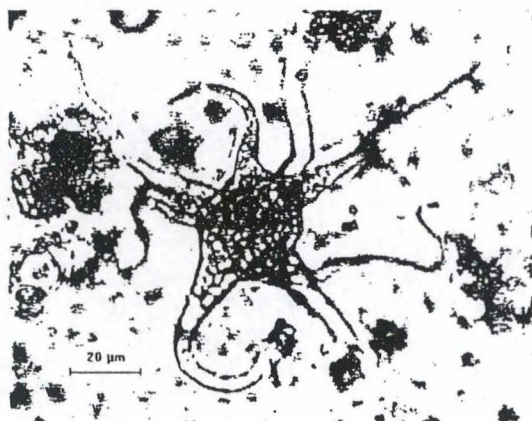
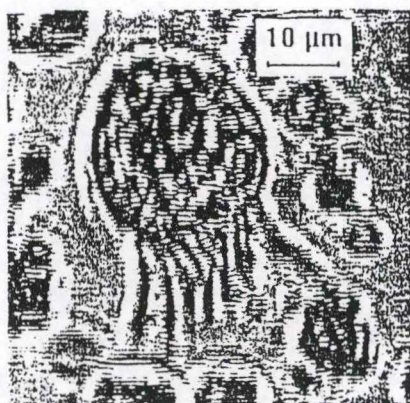
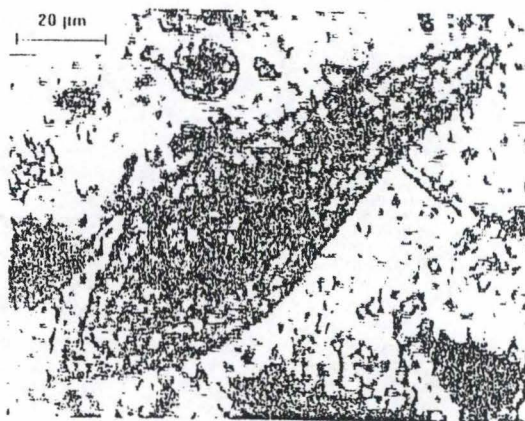


Fig. 8: Exemple d'amibe sans thèque pouvant être rencontré en Meuse (microscopie photonique) (CAUFMAN, 2000).



Cilié oligotriche (26–50μm)



Exemple de grand cilié (>100μm)

Fig. 9: Exemple de ciliés (cilié oligotriche, grand cilié(>100μm))pouvant être rencontré en Meuse (microscopie photonique)(CAUFMAN, 2000).

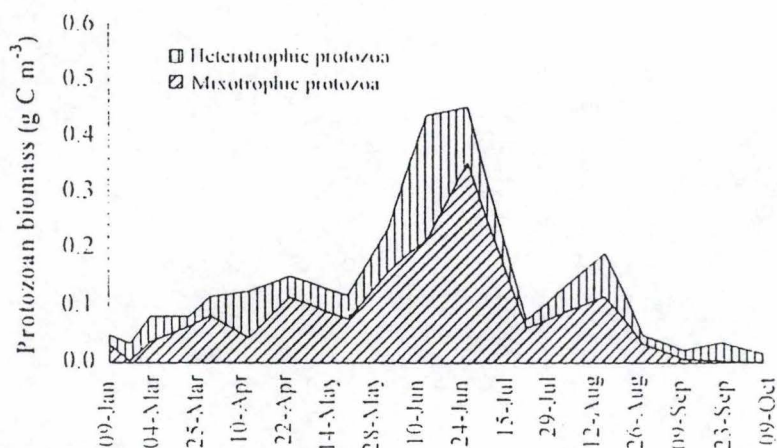


Fig. 10: Biomasses des protozoaires hétérotrophes et mixotrophes à la Plante (Meuse) En 1996

4. Etude en milieu fluvial : cas de la Meuse

Les grandes rivières européennes sont plutôt à tendance eutrophe: on constate souvent dans ces milieux des apports de matières organiques et de nutriments allochtones. Ces apports fréquents favoriseraient la production bactérienne et la production primaire.

Cependant, au printemps, la production de matières organiques autochtones n'est pas négligeable (SERVAIS & GARNIER, 1993) et, dans les grandes rivières, au moins là où les rejets d'eaux usées sont relativement faibles, on retrouve ce couplage production primaire/production bactérienne, le carbone nécessaire provenant principalement de la lyse et de l'excrétion algale (SERVAIS, 1989). Le phytoplancton se développe souvent bien en rivière, malgré la turbidité de ces milieux eutrophes, car une majeure partie de la croissance est réalisée dans les secteurs moins profonds et mieux éclairés de la rivière (DESCY *et al.* 1994).

Pour les protozoaires, VANDEVELDE en 1996, lors d'une étude sur la Haute Meuse belge (La Plante) a montré que l'on pouvait observer deux pics d'abondance, l'un vers la fin avril, principalement dû aux organismes mixotrophes (80%); l'autre mi-juin, constitué par 60% d'organismes hétérotrophes stricts. Notons que la plus grande partie de la biomasse des protozoaires est constituée par les ciliés. Les flagellés bien qu'étant très nombreux apportent peu de biomasse de part leur petite taille.

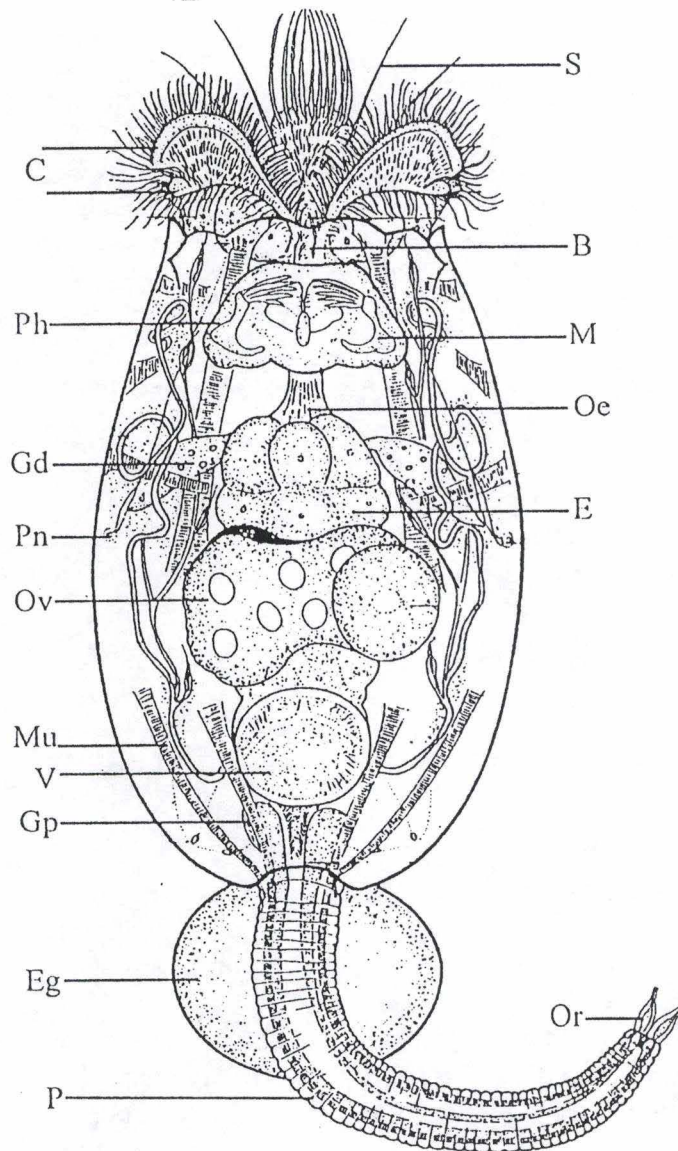


Fig. 11 : Organisation anatomique d'un rotifère femelle du genre *Brachionus*, en vue dorsale (adapté de NOGRADY, 1993 in VIROUX, 2000). L'ordre de grandeur de la taille du corps est de 500 μm . C - corona, Ph - pharynx, Gd - glande digestive, Pn - protonéphridie, Ov - ovaire, Mu - muscle, V - vessie, Gp - glande pédieuse, Eg - œuf, P - pied, S - soie sensorielle B - bouche, M - mastax, Oe - œsophage, E - estomac, Or - orteil.

Encore une fois, des études récentes montrent que les biomasses bactériennes sont régulées essentiellement par la pression de grazing effectuée par le protozooplancton (SERVAIS *et al.* 2000). Mais il ne sont pas les seuls acteurs de ce phénomène...

Le métazooplancton des milieux fluviaux se compose d'une communauté un peu différente que celle des milieux lenti-ques. Le temps de résidence de l'eau est, par définition, beaucoup plus court dans les rivières. Cette caractéristique favorise donc le métazooplancton à développement court, comme les rotifères et les petits crustacés cladocères. Les « grands » crustacés ont habituellement trop peu de temps pour accomplir leur développement jusqu'au stade adulte. Ils ne sont donc présents que sous formes larvaires (ex : les stades nauplii des copépodes). Ainsi, dans la Meuse, on retrouve beaucoup de petits métazoaires, les rotifères, qui dominent les communautés métazooplanctoniques toute l'année. Les crustacés vont se retrouver nombreux en été, la température plus élevée accélérant leur métabolisme et leur développement (VIROUX, 2000).

Les rotifères font partie des Nématelminthes, ce sont des pseudocoelomates de 0.1 à 1 mm. On peut les diviser en trois ordres, dont les Monogononta qui sont les représentants des communautés dulcicoles planctoniques. Chez les rotifères, la reproduction par parthénogenèse domine: les populations sont donc constituées la plupart du temps essentiellement de femelles.

En bonnes conditions, le développement des œufs ne dépasse pas 24 heures pour les générations parthénogénétiques.

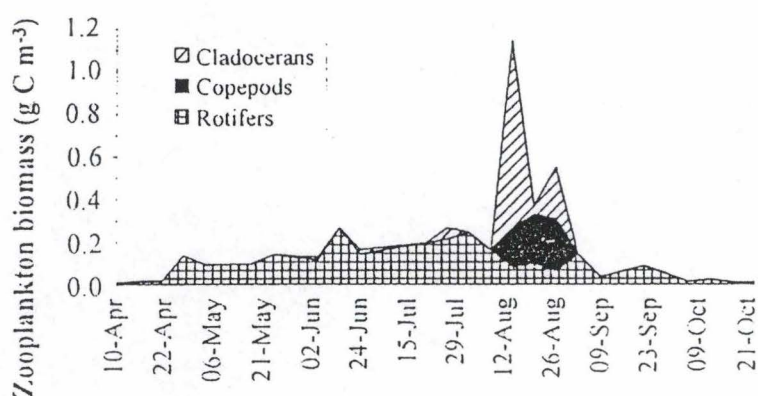


Fig. 12: Biomasses de métazooplancton en Meuse (La Plante) en 1996 (SERVAIS *et al.*, 2000).

Pour l'année 1996, on retrouve bien cette population de petit métazooplancton présentant des abondances de plus de 1000 ind.L⁻¹ pour la fin avril 1996. Celui-ci est composé principalement par des rotifères avec *Brachionus* spp., *Keratella* spp. et des Synchaetidae comme taxons dominants. On retrouve aussi des microcrustacés en août, avec un pic de 800 *Bosmina longirostris* par litre le 12 août. Des copépodes aux stades adulte et nauplii sont également présents. La biomasse maximum de métazooplancton (1.1 g C.m⁻³) est observée durant cette période, biomasse constituée essentiellement de cladocères et copépodes plus gros. Pendant les autres mois, la biomasse (jusque 0.27 g C.m⁻³) est principalement constituée par les rotifères (SERVAIS *et al.* 2000).

Au sein du métazooplancton, on peut distinguer des espèces qui ont un régime alimentaire généraliste, sans sélectivité apparente, et des espèces spécialisées dans la capture d'un même type de proie, voir d'une seule espèce (VANDERPLOEG, 1990). On distingue aussi deux stratégies de capture, une prédation basée sur la recherche active de la proie et une stratégie de filtration de l'eau, le prédateur sélectionnant ses proies sur base de taille.

En général, on considère les rotifères comme phytoplanctonophages (GOSSELAIN, 1998), mais ils peuvent aussi se nourrir de protozooplancton, le phytoplancton et le protozooplancton étant souvent du même ordre de taille. Par ailleurs, on sait aussi que les rotifères peuvent se nourrir de bactéries (OOMS-WILMS *et al.* 1995).

Les rotifères, en plus de leur rôle dans la chaîne trophique classique par ingestion de phytoplancton (de 0.17 à 22.8 ng C.ind.⁻¹.h⁻¹ (GOSSELAIN, 1998)), interviennent dans la boucle microbienne en ingérant des particules de 3 à 20 µm (POURRIOT, 1977), des protozoaires et de grosses bactéries.

En laboratoire, on a montré que des rotifères pouvaient survivre en se nourrissant uniquement de bactéries, pour autant que ces bactéries soient plus grandes que 0.5 µm (STARKWEATHER *et al.* 1979).

L'ingestion de bactéries par le métazooplancton constitue donc un court-circuit dans la boucle microbienne limitant ainsi les pertes par respiration du compartiment protozooplancton. Cependant, dans la nature, le grazing des bactéries par les rotifères dépasse rarement plus de 10 % du grazing total exercé sur la communauté bactérienne (ARNDT, 1993).

Définitivement, ce sont les protozoaires qui ont la plus forte influence sur la mortalité bactérienne. On s'intéresse aux dynamiques de population pour vérifier et quantifier l'existence d'interactions entre les bactéries et les protozoaires. En 1996, on a pu mettre en relation l'augmentation de biomasse des protozoaires avec celle des bactéries. Sur les graphiques de la page suivante (SERVAIS *et al.* 2000), on peut voir que cette augmentation des biomasses démarre en même temps pour bactéries et protozoaires. Chez les protozoaires, le pic de biomasse redescend plus vite sans doute à cause de la pression de prédation exercée par le métazooplancton qui se développe bien à la mi-été (cfr. Fig. 12).

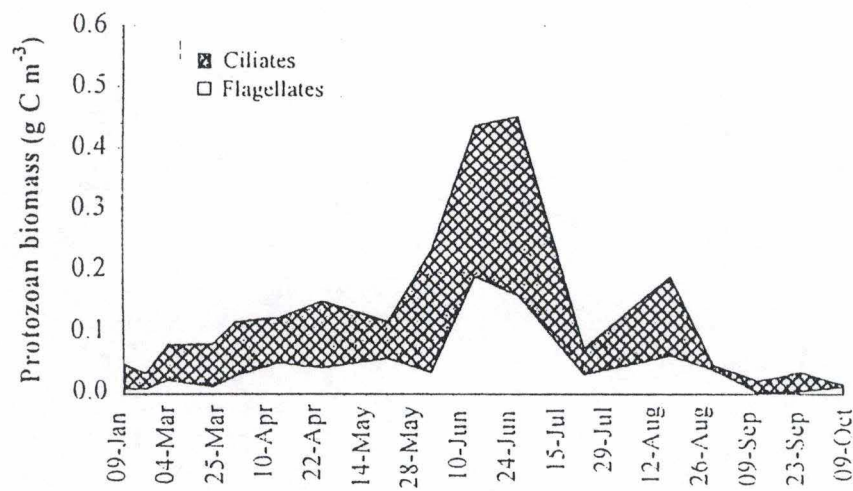


Fig. 13: Biomasse du protozooplancton en Meuse (La Plante) en 1996 (SERVAIS *et al.*, 2000).

Par microscopie à épifluorescence, on a pu déterminer en 1996 des valeurs de biomasse bactérienne allant de 0.02 à 0.5 g C m⁻³ (SERVAIS *et al.* 2000). Ces valeurs sont du même ordre chaque année.

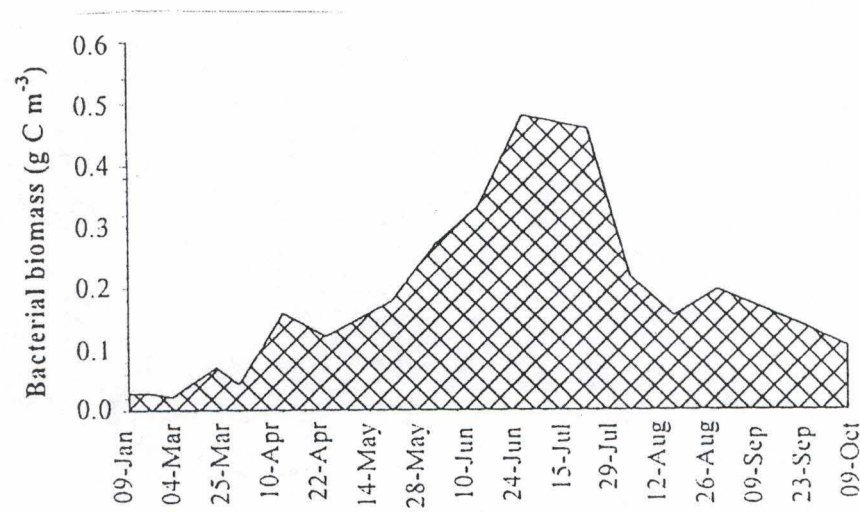


Fig. 14: Biomasse du bactérioplancton en Meuse (La Plante) en 1996 (SERVAIS *et al.*, 2000).

5. Objectif du mémoire

Dans le cadre d'un programme F.R.F.C. (Fonds de la Recherche Fondamentale Collective), on réalise une étude des relations trophiques au sein du plancton en milieu fluvial pour mieux connaître la boucle microbienne. Cette étude s'étend sur quatre ans en ayant débuté en 1999. Nous sommes donc à la troisième année, dédiée à la compréhension des différents processus de la boucle microbienne.

Mon travail s'inscrit donc dans cette optique d'étude des interactions entre organismes préalablement divisés en compartiments constituant la boucle microbienne. Plus précisément, on se concentre sur les interactions entre le bactérioplancton et le protozooplancton. Ils sont les plus petits de la biocénose et leur étude demande un travail à l'échelle du micron, qui s'effectue en collaboration avec le laboratoire d'Ecologie des Systèmes Aquatiques de l'Université Libre de Bruxelles, plus spécialisé en écologie microbienne.

On réalise donc un suivi des communautés planctoniques en Meuse, à Tailfer. Tout au long des campagnes, j'ai étudié la mortalité bactérienne, totale et par grazing en me basant sur deux méthodes.

La première méthode est un suivi de la décroissance du marquage du matériel génétique de bactéries par de la thymidine tritiée (SERVAIS *et al.* 1985; SERVAIS, 1989). Cette technique propose donc de suivre une communauté de bactéries sur quelques jours après incubation de cette communauté en présence d'un radiotraceur du matériel génétique bactérien. La décroissance de la radioactivité, due à la destruction du matériel génétique marqué, nous renseigne sur le taux de mortalité bactérien. Il s'agira d'un taux de mortalité total dans un échantillon laissé tel quel, et d'un taux de mortalité uniquement dépendant de la mortalité naturelle (sans tenir compte du grazing) si l'échantillon a été filtré sur filtres dont la porosité ne laisse pas passer les protozoaires (2µm). On pourra ainsi quantifier, par soustraction de la mortalité naturelle sur la mortalité totale, la part de mortalité due au grazing par les bactérivores.

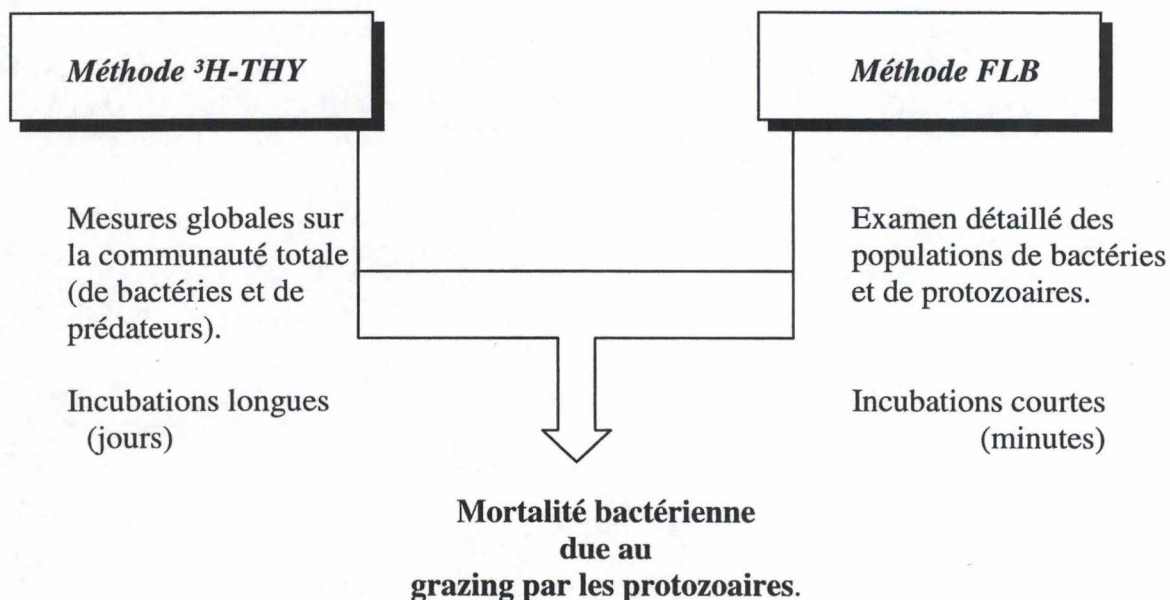
La seconde méthode est un suivi, en microscopie à épifluorescence, de l'ingestion par les protozoaires de bactéries marquées (FLB: Fluorescently Labeled Bacteria, bactéries marquées fluorescentes) avec des fluorochromes vitaux et non-vitaux. Ceci repose sur des comptages de protozoaires ayant ingéré un certain nombre de FLB après une période d'incubation s'étalant de 0 à 60 minutes. On obtiendra ainsi des taux d'ingestion pour les différents protozoaires (flagellés/ciliés, hétérotrophes/mixotrophes).

Les résultats obtenus avec les deux méthodes peuvent être comparés. SERVAIS *et al.* (1998) montre que les deux techniques donnent des résultats corrélés ($r^2=0.97$, $n=7$), mais que les valeurs venant de la méthode FLB avec colorants non-vitaux sont systématiquement inférieures à celles obtenues par l'autre méthode (en moyenne de 32%).

Ces différences s'expliquent d'abord par des raisons méthodologiques, la méthode FLB étant beaucoup plus fastidieuse et demande une certaine habitude de l'observation et le comptage des organismes planctoniques. Par ailleurs, certains chercheurs ont montré que des bactéries colorées vivantes sont ingérées préférentiellement aux bactéries colorées mortes (LANDRY *et al.* 1991; MONGER & LANDRY, 1992).

En 2000, LAMARRE proposait, sur des communautés de culture, des taux d'ingestion 30% supérieurs avec des bactéries marquées par des colorants vitaux qu'avec des bactéries marquées par des colorants non-vitaux. Il serait intéressant d'observer l'influence de la vitalité des bactéries sur le grazing des protozoaires "sauvages" et dans quelle mesure cela rehausse les résultats de taux d'ingestion par méthode FLB.

Ces deux méthodes se complètent bien car elles se basent sur des concepts opposés pour arriver à une évaluation d'un même processus. La méthode de marquage radioactif propose d'intégrer les variations possibles du taux d'ingestion sur une longue période avec le risque de voir la communauté évoluer, au cours de l'expérience, différemment que dans la nature. Par contre, la méthode FLB nous fournira des taux de mortalité bactérienne due au grazing par le protozooplankton qui seront calculés à partir d'observations ponctuelles des prédateurs après une courte incubation (quelques minutes) en présence de leur proie.



MATÉRIEL
&
MÉTHODES

1. Localisation et caractéristiques du site étudié

La Meuse prend sa source à Pouilly en Bassigny dans l'Est de la France, elle s'écoule sur 885 km à travers la Belgique et les Pays-Bas où elle rejoint le complexe deltaïque du Rhin avant de déboucher en Mer du Nord.

De l'amont vers l'aval, en Belgique, la Meuse collecte les eaux de divers affluents, parmi les principaux, on peut citer entre autres, la Semois, la Lesse, la Sambre et l'Ourthe. A partir de la Sambre (inclue), les affluents se situent en aval du site de prélèvement.

Sur les 194 km que parcourt le fleuve en Belgique, on peut mesurer une pente naturelle moyenne de 0,23 pour mille (MICHA & PILETTE, 1988). Cette pente naturelle a été nettement modifiée pour permettre la navigation des péniches. Quarante-six barrages se situent sur l'ensemble du fleuve dont seize en Belgique.

Le fleuve draine un bassin versant de 36 011 km² de superficie dont 40,7 % (soit 13 489 km²) se trouve en Belgique (MICHA & PILETTE, 1988); le reste est réparti sur la France, les Pays-Bas, le Grand-Duché du Luxembourg et l'Allemagne. Le bassin versant a la forme d'un long couloir de 150 km de long sur 15 à 40 km de large jusqu'à Verdun. Ensuite, il s'étale pour atteindre une largeur maximale d'environ 180 km dans la région de Dinant. Une bonne partie du bassin mosan repose sur des terrains calcaires.

Le site d'étude se trouve à Tailfer, quelques kilomètres en amont de Namur et à 521 km de la source du fleuve. C'est à Tailfer que la Compagnie Intercommunale Bruxelloise des Eaux (CIBE) pompe l'eau nécessaire pour l'alimentation en eau potable de toute une partie de la ville de Bruxelles. La CIBE effectue donc une surveillance permanente des qualités physico-chimiques de l'eau à cet endroit. Nous profiterons des données disponibles.

Les mesures physico-chimiques ont été réalisées depuis la jetée séparant l'écluse du cours principal tandis que les prélèvements d'eau ont été fait depuis le barrage, en amont de celui-ci et à proximité de la surface, au moyen d'une bouteille de type Van Dorn. Cet appareil se constitue d'un corps cylindrique transparent de 3 litres pourvu d'un mécanisme d'occlusion hermétique déclanchable à distance. Le transport jusqu'au laboratoire se fait à l'aide de jerrycans de 10 litres. L'eau brute nécessaire aux analyses est prélevée des jerrycans après homogénéisation.

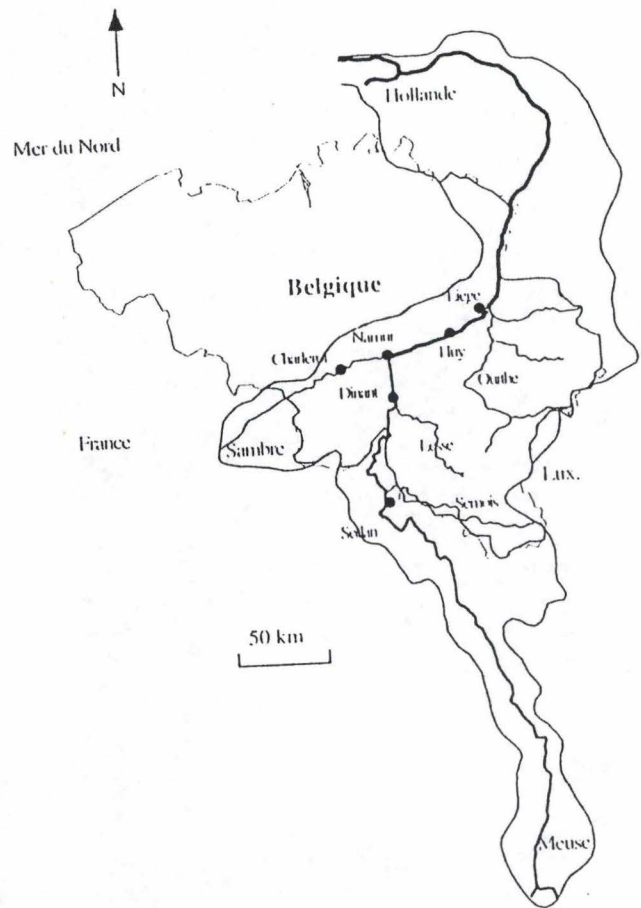


Fig. 15: Bassin de la Meuse et ses principaux affluents.

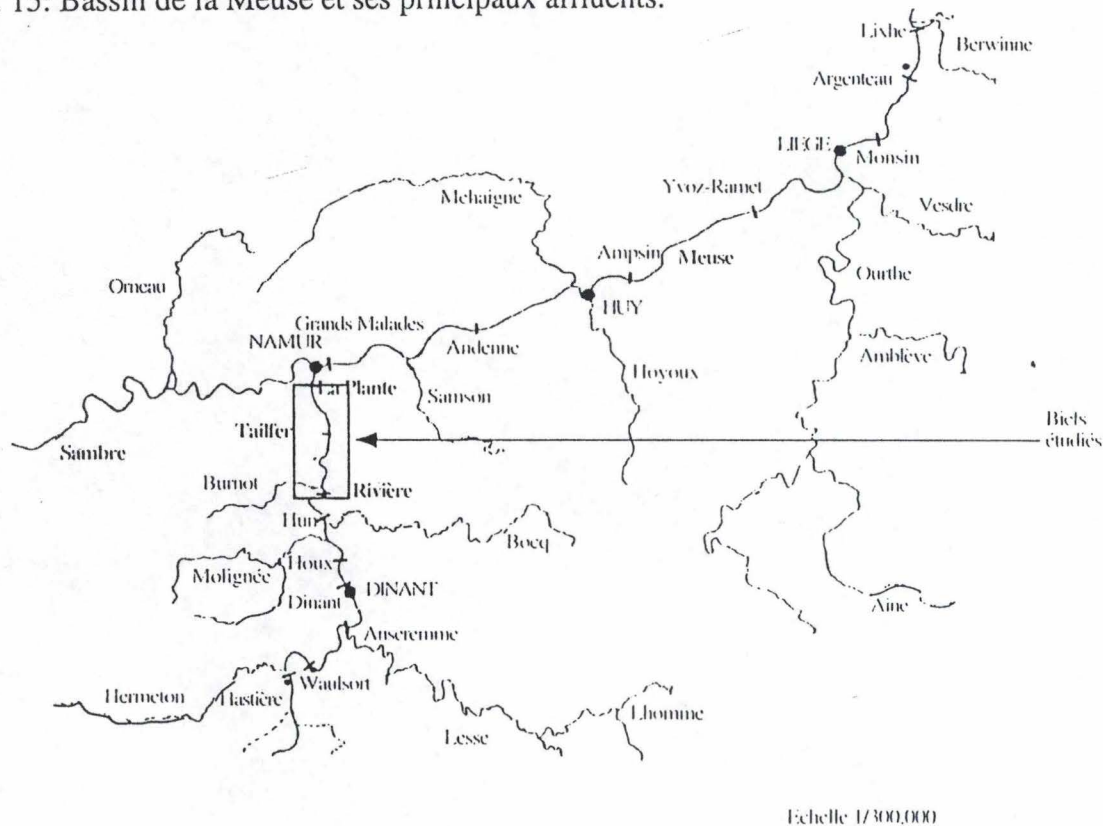


Fig. 16: Cartographie de la Meuse, localisation des barrages

2. Suivi de base

2.1. Analyses physico-chimiques

- *Température:*

La température de l'eau a été mesurée sur le terrain, à chaque campagne, à l'aide d'une sonde de température incorporée au pH-mètre WTW 323-A ou à un oxymètre YSI model 58 avec une précision de plus ou moins 0.1°C.

Des mesures quotidiennes de température et de débit du fleuve à Tailfer nous ont été transmises par la Compagnie Intercommunale Bruxelloise des Eaux (CIBE).

- *Mesures du pH:*

Les mesures de pH sont effectuées sur le terrain au moyen d'un pH-mètre WTW 323-A dont la précision atteint 0.01 unité de pH.

- *Oxygène dissous:*

Un oxymètre YSI model 58 a été utilisé pour mesurer l'oxygène dissous de l'eau de Meuse, sa précision est de 0.1 mg.l⁻¹.

- *Transparence de l'eau:*

La transparence de l'eau est mesurée sur le terrain par un dispositif qui comprend deux quantamètres connectés à un data logger. L'un, I₀ (senseur LI-COR 190 SB), sert de référence et mesure l'intensité lumineuse en surface. Il est placé sur la berge, dans un endroit exposé. L'autre senseur est immergé à différentes profondeurs (senseur sphérique LI-COR SPQA 2021) permettant ainsi de calculer l'éclairement à différentes profondeurs (I_z). Le coefficient d'extinction est ensuite obtenu par régression du logarithme népérien de l'intensité relative (I_z/I₀) en fonction de la profondeur.

On peut aussi estimer un coefficient d'extinction à partir de la concentration en chlorophylle *a* selon la formule suivante (voir GOSSELAIN, 1998):

$$k = 0.7 + 0.5 \text{ Chl } a$$

Cette deuxième méthode ne tient pas compte de la variation des concentrations en matières en suspension (MES) et par conséquent, les valeurs de *k* calculées peuvent être légèrement sous-estimées suite à des périodes pluvieuses.

- **Alcalinité:**

L'alcalinité de l'eau est mesurée au laboratoire par titrage de 50 ml d'eau filtrée par de l'HCl 0.02 N, en présence d'un indicateur virant à pH 4. On mesure donc l'alcalinité totale, c.à d. essentiellement les ions HCO_3^- et CO_3^{2-} .

2.2. Nutriments

La Meuse a des eaux alcalines, riches en nutriments. Une certaine variation de la concentration des différents nutriments peut apparaître sur un cycle annuel en raison de la variabilité de l'apport par le bassin versant surtout pour l'azote et la silice. Les variations de la concentration en phosphore, elles, sont plutôt influencées par des apports en eaux usées que par des affluents diffus.

La concentration en nutriments dépend aussi de la consommation par les producteurs primaires. Pour la production bactérienne, même si une grande partie des ses besoins en nutriments est comblée par des apports organiques, elle nécessite aussi un apport de certains nutriments inorganiques comme les orthophosphates pour lesquels les bactéries entrent d'ailleurs en compétition avec les producteurs primaires. Toutefois, en Meuse, la concentration en nutriments n'atteint généralement pas un seuil en dessous duquel la croissance algale serait limitée (DESCY *et al.* 1987).

Tous les dosages de nutriments ont été effectués sur de l'eau filtrée sur filtres en fibres de verre Whatman GF/C. Les dosages réalisés sont:

- Les différentes formes d'azote
- Les orthophosphates
- La silice

- **Azote:**

L'azote inorganique dissous dans l'eau se retrouve sous la forme d'ammoniaque, de nitrites et de nitrates.

Ammoniaque:

L'ammoniaque (NH_4^+) réagit avec les ions hypochlorites, issus de l'hydrolyse alcaline du dichloroisocyanurate et avec le salicylate de sodium en présence du nitroprussiate de sodium, qui agit comme catalyseur, pour former un composé coloré. La coloration est bleue mais apparaît verte, interférence due à la couleur jaune du réactif. L'absorbance est mesurée à 655 nm.

Nitrites:

La diazotation de l'acide sulfanilique et la présence de l' α -naphtylamine donne un complexe rouge dont l'absorbance se lit à 520 nm.

Nitrates:

Les nitrates sont convertis en nitrites à l'aide de cadmium, puis l'échantillon réduit est dosé par la méthode à l' α -naphtylamine, ce qui donne la somme $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$.

- **Orthophosphates (SRP):**

Les orthophosphates (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) constituent les principaux représentant du phosphore inorganique dissous (Soluble Reactive Phosphate).

En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique qui, réduit par l'acide ascorbique, développe une coloration bleue dont l'absorbance est mesurée à 882 nm.

- **Silice:**

La silice "réactive" présente dans les eaux naturelles concerne les formes dissoutes (monomères ou polymères d'acide orthosilicique H_4SiO_4).

A pH acide, les ions siliciques forment un complexe jaune avec les ions molybdates; ceux-ci sont ensuite réduits par du chlorure d'étain en un complexe bleu afin d'augmenter la sensibilité. L'absorbance peut-être lue au spectromètre à 815 nm.

3. Les communautés planctoniques

Le programme F.R.F.C. (Fond de Recherche Fondamentale Collective) vise l'étude des relations trophiques des relations trophiques au sein du plancton fluvial et en particulier l'étude de la boucle microbienne. Dans ce cadre, tous les représentants des différents niveaux trophiques ont été prélevés pour être étudiés. Une compréhension globale pourra ainsi remettre dans son contexte l'étude sur la mortalité bactérienne dont il s'agit dans ce mémoire.

Les collectes sont réalisés à la bouteille Van Dorn, puis, l'échantillon est traité comme suit:

- Pour le phytoplancton, 500 ml d'eau brute sont fixés au moyen de lugol.
- Pour le bactérioplancton, 20 ml sont fixés au formol en vue de comptages ultérieurs au laboratoire du Professeur P. Servais à l'ULB (Ecologie des Systèmes Aquatiques); les études de mortalité sont, elles, initialisées dans les heures qui suivent après la récolte, aucun conditionnement n'étant réalisé si ce n'est un maintien du jerrycan à température *in situ*.
- Pour le protozooplancton, de l'eau brute est incubée en présence de microsphères fluorescentes (FMP), l'incubation se termine par une fixation au glutaraldéhyde 2 %. Le formol ne peut être utilisé pour fixer les protozoaires car il entraîne des phénomènes d'égestion de FMPs. Les examens subséquents sont effectués par le laboratoire du Professeur J.-P. Thomé à l'ULg (Ecologie Animale et Ecotoxicologie). Les mesures d'ingestion de bactéries fluorescentes (FLB) par les protozoaires sont réalisées dans les heures qui suivent le prélèvement. Les échantillons sont conservés au glutaraldéhyde 2 % en vue d'un examen microscopique ultérieur au laboratoire du Professeur P. Servais à l'ULB (Ecologie des Systèmes Aquatiques).
- Pour le métazooplancton, on n'utilise pas de bouteille Van Dorn. Mais une trappe de Schindler de 10 l; il s'agit d'un système de collecte d'eau, celle-ci ne pouvant s'écouler qu'au travers d'un filtre de 63 μ m, concentrant le plancton alors même que la trappe est remontée à la surface. Cette trappe est utilisée à plusieurs reprises sur toute la largeur du cours d'eau pour concentrer un volume d'eau de 120 l. Le plancton concentré est récupéré dans un faible volume d'eau et fixé au lugol acidifié selon LEAKEY *et al.* (1994).

3.1. Etude du phytoplancton

3.1.1. Biomasse phytoplanctonique

L'estimation de la biomasse algale présente dans le milieu peut se faire via une quantification de la chlorophylle *a*. Pour la Meuse, la biomasse algale peut être exprimée en unité de carbone en multipliant les valeurs de Chl *a* par 37 (DESCY & GOSSELAIN, 1994).

Sans entrer dans les détails, deux techniques peuvent être utilisées pour doser la concentration en pigments chlorophylliens:

- *Dosage de la chlorophylle a en spectrophotométrie:*

Un volume connu de l'échantillon est filtré sur filtre GF/C pour retenir les pigments. On va ensuite effectuer une extraction de ces pigments chlorophylliens au moyen d'un solvant composé de cinq volumes d'acétone 90 % pour un volume de méthanol (PECHAR, 1987); le tout est chauffé à 65 -70 °C pendant 3 minutes. Après refroidissement, on mesure l'absorbance à 665 nm.

La lecture de l'absorbance après acidification (100 µl d'HCl 0.1 N pour 3 ml d'extrait) permet de supprimer l'erreur due à la présence éventuelle de pigments chlorophylliens dégradés (LORENZEN, 1967 in FRANCOIS, 2000). En effet, la chlorophylle *a* est rapidement transformée en phéopigments par acidification, ce qui entraîne une diminution d'absorbance; cette transformation ne se produit pas pour les pigments déjà dégradés. La différence d'absorbance avant et après acidification permet donc de déterminer la teneur en Chl *a* active.

La concentration en Chl *a* est donnée par les équations de Lorenzen (1967) adaptées par MARKER *et al.* (1980 in FRANCOIS, 2000):

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{gC/l)} = (\text{Db}-\text{Da}) \times 27 \times (\text{v}/(\text{V} \times \text{L}))$$

Où: Da est la densité optique après acidification,
Db est la densité optique avant acidification,
v est le volume de solvant (en ml),
V est le volume d'eau filtré (en l) et
L est la longueur du trajet optique de la cellule en cm.

L'avantage de cette méthode est sa rapidité, ce qui permet une mesure de la biomasse algale dès le retour au laboratoire.

- **Dosage des pigments chlorophylliens et caroténoïdes en HPLC:**

Nous ne détaillerons pas ici la méthode de dosage; retenons juste qu'elle demande plus de temps pour être réalisée mais qu'elle donne néanmoins des résultats plus précis.

Il s'agit toujours d'une extraction des pigments, cette fois en utilisant comme unique solvant l'acétone 90 % et deux sonications de 15 min. (DESCY *et al.*, 2000). Les différents pigments sont alors séparés en HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), technique qui discrimine les différentes molécules selon leur propriétés physico-chimiques. Les pigments élués sont détectés en absorbance à 436 nm et en fluorescence (pour la détection des pigments chlorophylliens et de leurs dérivés).

Une conversion des concentrations en pigments en valeurs de biomasse est réalisée au moyen du programme CHEMTAX (MACKAY *et al.* 1996). Ce programme permet d'évaluer les biomasses phytoplanctoniques par catégorie de phytoplancton grâce à une analyse basée sur les rapports pigments marqueurs / chlorophylle *a*, caractéristiques de différents groupes d'algues.

En Meuse, nous décrirons les variations de biomasse pour quatre catégories:

- les Diatomées
- les Chlorophycées
- les Cryptophycées
- les Cyanobactéries

Les autres classes d'algues potentiellement présentes, Dinophycées, Euglénophycées et Chrysophycées sont rares ou présentes à très faible biomasse dans la Meuse (DESCY, 1987; GOSSELAIN *et al.* 1994; GOSSELAIN, 1998; VIROUX, 2000).

3.1.2. Production Primaire

La production primaire a été mesurée dans des flacons placés dans un incubateur laissant passer des intensités lumineuses relatives différentes. Chaque flacon est rempli avec 100 ml d'eau brute dans lesquels sont ajoutés 10 μCi de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ et est incubé pendant une courte durée (1h à 2h30) sur le site de l'étude (t° et éclairement *in situ*), un flacon "sombre" est incubé pour mesurer l'assimilation de carbone inorganique à l'obscurité.

On estime que le carbone inorganique marqué est assimilé par les algues au même taux que le carbone inorganique non marqué, ce qui peut s'écrire:

$$\frac{{}^{14}\text{C assimilé}}{{}^{14}\text{C total}} = \frac{{}^{12}\text{C assimilé}}{{}^{12}\text{C total}}$$

on en déduit :

$${}^{12}\text{C assimilé} = \frac{{}^{14}\text{C assimilé}}{{}^{12}\text{C total}} \times {}^{12}\text{C total}$$

Il suffit donc de déterminer la radioactivité des algues (recueillies sur un filtre adéquat) après incubation (${}^{14}\text{C}$ assimilé), l'activité initiale de l'échantillon (${}^{14}\text{C}$ total) et le C inorganique total (mesure de l'alcalinité et calcul du C inorganique assimilable).

$$\text{C assimilé (mg C.l}^{-1}\text{.h}^{-1}) = \frac{A - B}{A_i \times V} \times {}^{12}\text{C} \times 1.06 \times \frac{1}{t}$$

Où :

A est l'activité du filtre correspondant à l'échantillon (dpm)

B est l'activité du filtre correspondant au flacon sombre

A_i l'activité initiale en dpm.ml⁻¹ (témoin)

V le volume d'échantillon filtré en ml

${}^{12}\text{C}$ le carbone inorganique total (calculé à partir de la mesure du pH, de la température et de l'alcalinité) en mg par litre.

1.06 une correction pour la discrimination isotopique

t le temps d'incubation en h

Afin de mesurer la radioactivité introduite, trois témoins sont mesurés: on prélève 250 µl de l'eau marquée que l'on place dans une fiole à scintillation de 20 ml en présence de 250 µl de phényléthylamine.

En fin d'incubation, l'assimilation est stoppée par ajout de 2 ml de formol 2 % pour 100 ml.

Le contenu de chaque bouteille est filtré sur des filtres Whatman GF/C. Après rinçage à l'HCl 0,1 N (pour l'élimination des résidus de C inorganique), les filtres sont placés dans des fioles à scintillation de 20 ml.

L'activité de chaque filtre ainsi que des témoins est mesurée au compteur à scintillation Beckman LS 6000 SC après ajout d'au moins 10 ml de liquide scintillant Lumasafe plus.

Le calcul de la production primaire journalière par m² est basé sur la relation photosynthèse-lumière caractérisée par les deux paramètres P_{opt} (activité photosynthétique à saturation par la lumière) et I_k (intensité au seuil de la saturation). Les courbes ont été ajustées aux points expérimentaux au moyen du logiciel Statistica et selon la formule de Vollenweider (1965) simplifiée :

$$P(z,t) = 2 P_{\max} \frac{I(z,t) / 2 I_k}{1 + \{I(z,t) / 2 I_k\}^2}$$

Où:

P(z,t) est la production algale à la profondeur z et au temps t

I(z,t) est la radiation photosynthétique active (PAR) à la profondeur z et au temps t, calculée sur base de la radiation incidente et au coefficient vertical d'atténuation de la lumière dans l'eau.

La production brute journalière (PBJ) sur la colonne d'eau a été calculée à partir des variations journalières d'éclairement comme décrit dans DESCY et al. (1987).

$$PBJ = \int_0^d \int_r^s 2 P_{\max} \frac{I(z,t) / 2 I_k}{1 + [I(z,t) / 2 I_k]^2} dt dz$$

Où :

d est la profondeur de la colonne d'eau

r et s sont les heures de lever et de coucher du soleil

Les valeurs de l'éclairement sur l'ensemble du spectre lumineux pour chaque demi-heure nous ont été communiquées par l'Institut Royal Météorologique (IRM). Les valeurs utilisées sont les valeurs de PAR (estimé à 50 % de la radiation totale), moins la partie réfléchie en surface (on considère qu'elle équivaut à 5 %).

La production nette a été estimée par différence entre la production brute et la respiration algale. Celle-ci a été déterminée à partir de P_{max} selon la relation suivante (DESCY *et al.*, 1994) :

$$r = (0.046 \times P_{max}) + 0.073 \quad (\text{mgC. mgChl}a^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$$

La respiration journalière sur la colonne d'eau (R) a été obtenue en multipliant r par la concentration en Chl a , par la profondeur moyenne du secteur de rivière considéré et par 24 h. La profondeur utilisée est la profondeur moyenne estimée du tronçon de rivière, c'est à dire 4 m. Le taux de croissance algale (μ), exprimée en j^{-1} , a été calculée selon la relation exponentielle :

$$\mu = \text{Ln} (1 + \text{PN} / \text{B})$$

Où :

PN est la production algale nette, en $\text{g C m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$,

B la biomasse algale exprimée en g C m^{-2} , calculée à partir de la Chl a et de la profondeur moyenne.

3.2. Etude du bactérioplancton

3.2.1. Biomasse bactérienne

- *Principe du comptage en microscopie:*

Les méthodologies permettant d'estimer l'abondance des bactéries dans les milieux aquatiques sont diverses et variées. La plus ancienne (technique CFU) est basée sur le développement de colonies, après ensemencement d'un milieu nutritif solide par une suspension bactérienne. Cette méthode permet de mesurer l'abondance en bactéries cultivables sur un milieu considéré comme optimum.

Cette méthode est connue pour sous-estimer l'abondance des bactéries dans les milieux aquatiques naturels.

La microscopie à épifluorescence permet aujourd'hui de compter les bactéries totales après coloration par un fluorochrome spécifique des acides nucléiques : acridine orange (DALEY & HOBBIÉ, 1977), ou le DAPI (4'-6 diaminophénylindole) (PORTER & FEIG, 1980). Les organismes ainsi colorés et recueillis par filtration sur une membrane noire, fluorescent sous l'effet de la lumière UV, émise par une lampe à vapeur de mercure. La lumière réémise est filtrée par un miroir vers les oculaires, ce qui permet de visualiser les microorganismes.

- **Protocole:**

Dans ce travail, le DAPI (4'-6 diaminophénylindole), qui se lie spécifiquement à l'ADN a été utilisé pour énumérer les bactéries, selon la procédure décrite par PORTER & FEIG (1980).

Les bactéries présentes dans l'échantillon d'eau de Meuse sont fixées par addition de formaldéhyde (2% en concentration finale) et conservées à + 4°C. Un volume connu de cet échantillon (50 µl à 2 ml), est coloré par une solution de DAPI (1 µg/ml) préfiltrée sur une membrane stérile de porosité 0.2 µm (Sartorius), pendant 10 à 15 minutes à l'obscurité. L'échantillon est ensuite filtré sur une membrane noire Nuclepore en polycarbonate (porosité 0.2 µm et de diamètre 25 mm).

Après filtration, la membrane est montée sur une lame de microscope et recouverte d'une goutte d'huile à immersion (Olympus, nd=1.516), puis d'une lamelle. Les bactéries sont alors comptées sur 10 champs microscopiques différents au grossissement 1000 fois, avec un microscope à épifluorescence (Leica, DMRXA) équipé d'une lampe à vapeur de mercure et d'une combinaison de filtres DAPI (filtre d'excitation : 340-380 nm, miroir séparateur 400 nm, filtre d'arrêt 340 nm). Si les comptages bactériens ne sont pas effectués immédiatement, les lames sont conservées à + 4°C, à l'obscurité.

La connaissance du rapport surface utile du filtre sur celle d'un champ de comptage permet d'estimer le nombre de bactéries par unité de volume en fonction du volume filtré:

$$\text{Abondance (bact.l}^{-1}\text{)} = n \cdot 49087,39 \cdot \frac{1000}{V}$$

n = nombre moyen de bactéries par champ

49087,39 = nombre de champs de comptages dans la surface utile d'un filtre

V = volume filtré (ml)

- Calcul du biovolume et de la biomasse:

Lors de l'observation microscopique, la taille des bactéries est estimée à l'aide d'un oculaire portant un réticule gradué et étalonné.

En règle générale, deux types de bactéries peuvent être observées dans les milieux aquatiques naturels, d'une part les bactéries sphériques et d'autre part, des bâtonnets. Les volumes bactériens sont calculés en considérant les premières comme des sphères et les secondes comme des cylindres dont les deux extrémités sont des demi-sphères (WATSON *et al.*, 1977; FUHRMAN et AZAM, 1980). Pour chaque catégorie, les volumes sont calculés sur base des formules suivantes:

$$- \pi \cdot l^3/6 \text{ pour les sphères}$$

$$- \pi \cdot l^2 \cdot (L - l/2) + (\pi \cdot l^3/6) \text{ pour les bâtonnets}$$

L et l étant respectivement la longueur et la largeur des bactéries, exprimé en μm .

A partir du dénombrement des bactéries et de la connaissance de leur volume, un biovolume bactérien moyen sur 100 bactéries mesurées peut être calculé. Le facteur de conversion entre biovolume (μm^3) et biomasse bactérienne (μgC) utilisé est celui défini par SIMON et AZAM (1989) qui prend en compte les variations du rapport carbone/biovolume en fonction de la taille des cellules.

3.2.2. Production bactérienne

Parmi les diverses méthodes développées pour mesurer l'activité bactérienne en milieu aquatique, l'incorporation de thymidine marquée radioactivement, (FUHRMAN & AZAM, 1980, 1982) dans l'ADN bactérien et de leucine marquée (KIRCHMAN *et al.*, 1985) dans les protéines, qui permettent d'estimer la production bactérienne, sont actuellement les plus utilisées. Dans le cadre de notre travail, c'est la technique de marquage de l'ADN bactérien qui a été choisi.

- Mesure de la synthèse d'ADN bactérien:

La mesure consiste à évaluer la production bactérienne à partir du taux de synthèse de l'ADN bactérien (FUHRMAN & AZAM, 1980, 1982). La synthèse de l'ADN est en effet directement proportionnel au taux de division cellulaire des bactéries.

On peut estimer le taux de synthèse de l'ADN par la mesure d'incorporation de (méthyl-³H)-thymidine dans l'ADN des bactéries hétérotrophes. On utilise préférentiellement la thymidine à un autre nucléoside car celle-ci est uniquement précurseur de l'ADN et non de l'ARN.

Pratiquement la méthode consiste à incuber trois flacons (triplicat) contenant 10 ml d'échantillon d'eau de Meuse en présence de ³H-thymidine (radioactivité spécifique 43 µCuries/nmoles) à une concentration finale de 20 nM comme proposé par SERVAIS (1989).

Après ± 1 heure d'incubation à la température *in situ*, on bloque la réaction avec 5 ml de TCA 15 % à 0°C. Le précipité récolté sur un filtre en nitrate ou acétate de cellulose (Sartorius) de porosité 0.2 µm est rincé trois fois avec du TCA 5%. La radioactivité incorporée et donc récoltée sur le filtre 0.2 µm en nitrate ou acétate de cellulose, est mesurée par scintillation liquide (scintillateur Packard Tri-Carb) en présence de 10 ml de "Filter Count" (Lumasafe Plus).

La vitesse d'incorporation (v) de la thymidine est calculée par la relation suivante:

$$v \text{ [nmoles/l.h.]} = \frac{\text{DPM inc.}}{\text{DPM aj.}} \times \text{nmoles aj.} \times t^{-1} \times (1000/V)$$

avec :

- DPM inc.: radioactivité (exprimée en désintégration par minute) incorporée dans la fraction insoluble au TCA froid.
- DPM aj. : quantité de radioactivité ajoutée à l'échantillon sous forme de thymidine tritiée.
- nmoles aj.: quantité totale de thymidine tritiée ajoutée en nanomole.
- t: temps d'incubation en heure.
- V: volume d'échantillon incubé en présence de thymidine, exprimé en ml.

Rem. : les valeurs exprimées en DPM tiennent compte du rendement du scintillateur (Packard Tri-Carb) pour le comptage du tritium.

Afin de convertir les mesures de taux d'incorporation de thymidine tritiée en production cellulaire (nombre de cellules produites/l.h.), il est nécessaire d'utiliser un facteur de conversion (cellules produites par mole de thymidine incorporée dans la fraction insoluble au TCA froid). Ce facteur de conversion a été déterminé dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans le travail sur les eaux de la Haute Meuse belge (SERVAIS, 1989), il est de $0.5 \cdot 10^{18}$ cellules par mole de thymidine incorporée (figure 17). Cette valeur se situe dans la gamme des facteurs de conversion qui peuvent être calculés sur des bases théoriques ($0.3 \cdot 10^{18}$ à $0.6 \cdot 10^{18}$ cellules/mole thymidine incorporée) (SERVAIS, 1995).

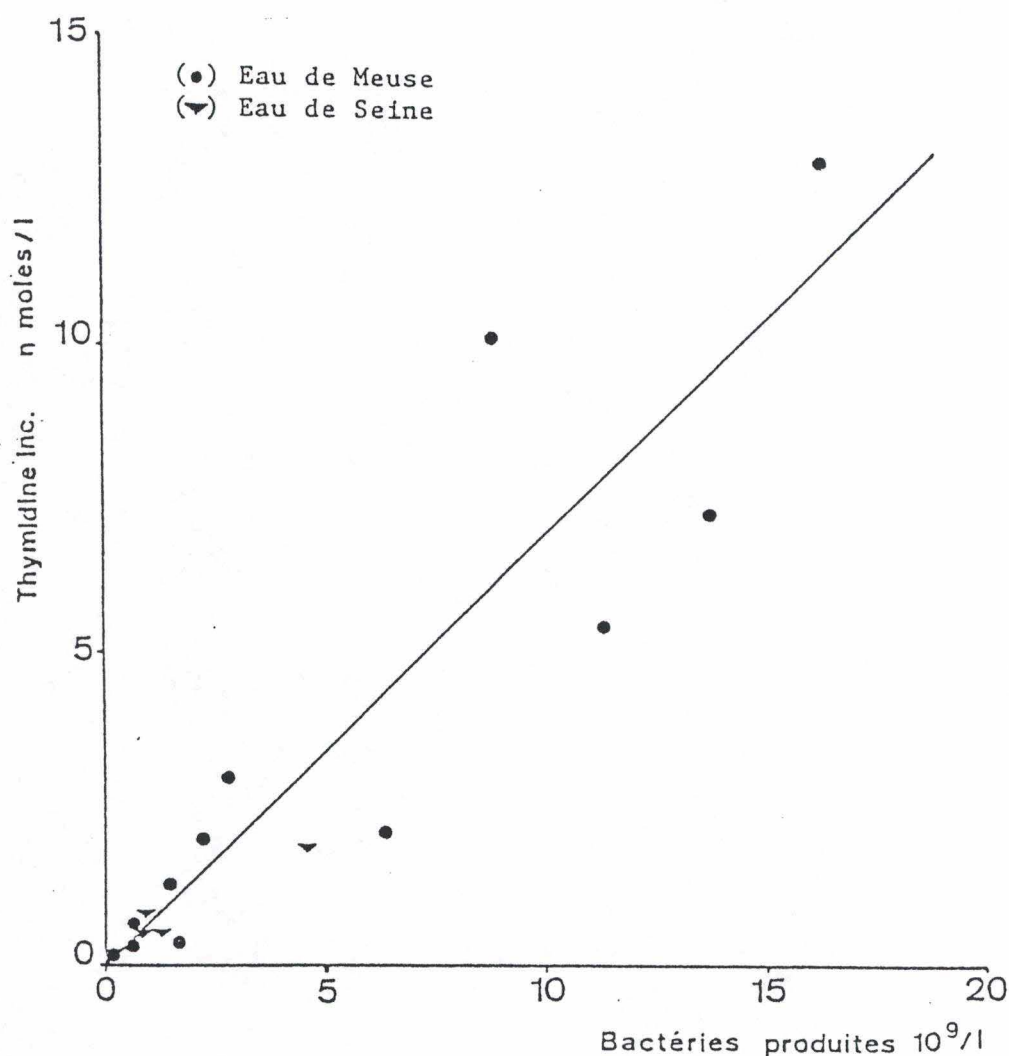


Fig. 17: Relation entre l'accroissement du nombre de bactéries et l'intégrale de l'activité d'incorporation de thymidine dans la fraction insoluble au TCA froid, dans une série d'expérience d'incubation. La droite correspond à un facteur de conversion de $0.5 \cdot 10^{18}$ bactéries formées/mole de thymidine incorporée dans la fraction insoluble au TCA froid (SERVAIS, 1989).

La production bactérienne exprimée en μgC de biomasse produite par litre et par heure, peut être calculée à partir de la production cellulaire en multipliant cette dernière par le contenu moyen en carbone des cellules bactériennes (voir chapitre 3.2.1.).

3.2.3. Mortalité bactérienne

Le processus de mortalité bactérienne totale inclut, la mortalité due à l'ingestion des bactéries, principalement par les protozoaires, ainsi que la lyse bactérienne spontanée ou induite (due aux virus, bactéries, ou à d'autres facteurs).

- *Principe de la méthode:*

La méthode est basée sur le marquage de l'ADN bactérien par la thymidine tritiée; elle consiste pratiquement à suivre la disparition du marquage dans l'ADN après élimination du milieu de la thymidine non incorporée (SERVAIS *et al.*, 1985, 1989).

Par cette méthode, SERVAIS *et al.* (1985) ont montré que la mortalité bactérienne obéit, dans la plupart des cas, à une cinétique du premier ordre (droite en représentation semi-logarithmique) pouvant être caractérisée par une constante du premier ordre k_t :

$$B(t) = B(t_0) \cdot e^{-k_t \cdot (t-t_0)}$$

Avec :

- $B(t)$ et $B(t_0)$ représentent la biomasse bactérienne présente respectivement aux temps t_0 et t (exprimés en heure).
- k_t est le taux de mortalité total exprimé en h^{-1}

La mesure effectuée en parallèle dans un échantillon naturel non modifié, un échantillon filtré sur filtre $63\mu\text{m}$ pour retenir le métazooplancton et un échantillon filtré sur une membrane de porosité $2\mu\text{m}$ retenant les brouteurs de bactéries permet de déterminer par différences la part de la mortalité due au broutage (grazing) dans la mortalité totale bactérienne (SERVAIS *et al.*, 1985; BECQUEVORT, 1987).

D'un point de vue écologique, la différenciation entre broutage et lyse bactérienne est primordiale; en effet, les bactéries broutées par le zooplancton se dirigent par cette voie vers les niveaux trophiques supérieurs, tandis que la lyse conduit à un recyclage de matière organique.

- *Protocole expérimental:*

A un échantillon de 300 ml d'eau de Meuse placé à température *in situ* et à l'obscurité, sont ajoutés 600 µl de thymidine tritiée (activité spécifique 43 µCuries/nmole) pour obtenir une concentration finale de 4 nM. L'échantillon est incubé pendant une vingtaine d'heures afin de permettre à la thymidine tritiée d'être incorporée totalement dans l'ADN bactérien et éliminée du milieu.

A ce moment l'échantillon est divisé en trois sous-échantillons de 100 ml. Le premier n'est pas modifié, le second est filtré sur une membrane de porosité 63 µm (filtre Nucléopore) pour séparer le métazooplancton du protozooplancton, le troisième est filtré sur une membrane de porosité 2 µm (filtre Nucléopore) et des inhibiteurs de l'activité des protozoaires sont ajoutés (colchicine: concentration finale 100 mg/l et cycloheximide: concentration finale 200 mg/l). La filtration et l'addition des inhibiteurs permet dans ce sous-échantillon, d'éliminer le broutage des protozoaires.

Des aliquotes de 5 ml sont prélevées toutes les 10 à 20 heures pendant environ 80 heures et additionnées de 2.5 ml de TCA 15% froid. La radioactivité associée à la fraction macromoléculaire est mesurée comme dans la procédure d'incorporation de thymidine tritiée pour mesurer la production bactérienne (voir chapitre 3.2.2.).

On porte sur un graphique semi-logarithmique la diminution de radioactivité dans l'ADN bactérien dans les trois sous-échantillons en fonction du temps (figure 18). Le coefficient angulaire de la droite obtenue pour le sous-échantillon non modifié et celui filtré sur 63 µm, nous permet de déduire respectivement: le taux de mortalité bactérienne total (k_t) et le taux de mortalité total moins le grazing du métazooplancton (k_{t-m}), tous deux exprimés en h^{-1} . Le coefficient angulaire de la droite obtenu à partir des résultats du sous-échantillon filtré et inhibé nous permet de calculer le taux de mortalité en l'absence de broutage, donc la mortalité due à la lyse bactérienne (k_l). Le taux de mortalité dû à l'ingestion par les protozoaires (k_p) et celui dû à l'ingestion par les métazoaires peuvent être calculés de la façon suivante:

$$k_p = k_{t-m} - k_l$$

$$k_m = k_t - k_{t-m}$$

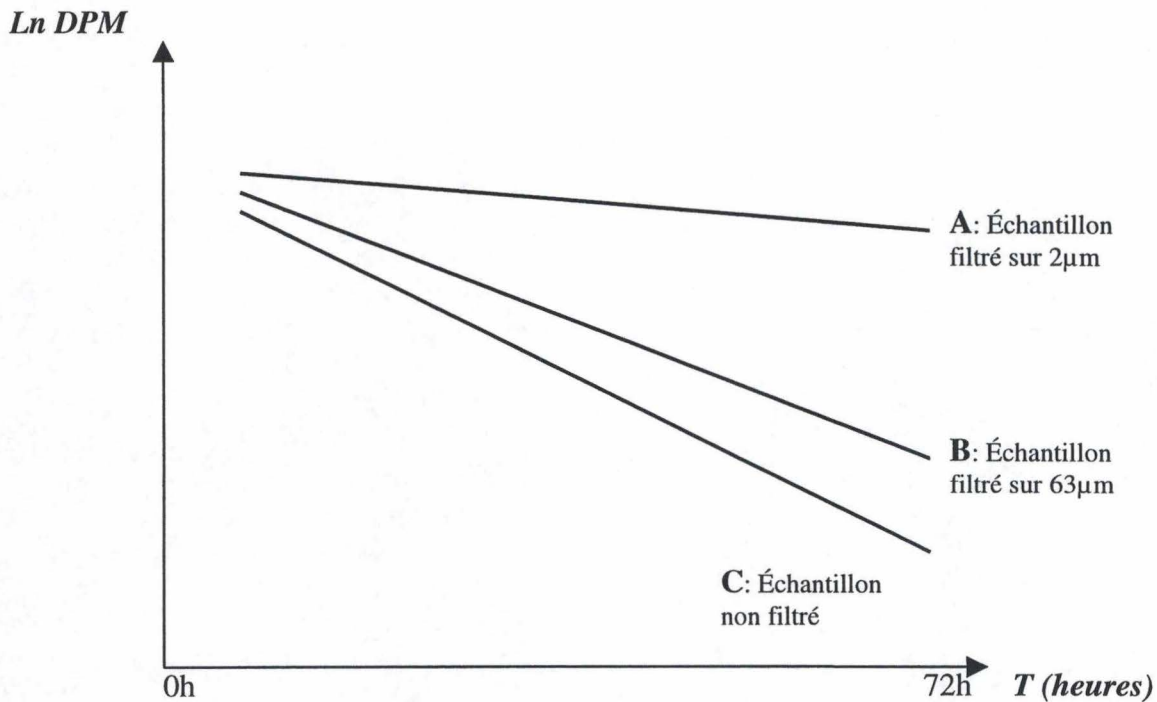


Fig. 18: Evolution de la radioactivité de l'ADN bactérien dans trois échantillons de 100 ml d'eau de Meuse (Rem: 0h correspond au premier point mesuré 24 heures après l'inoculation de thymidine tritiée, juste après séparation en trois fractions des 300 ml et filtration des deux échantillons concernés).

Les taux de mortalité sont estimés à partir de la décroissance de radioactivité des macromolécules retenues sur le filtre $0,2 \mu m$. Ce sont donc, dans le graphique ci-dessus, les pentes des droites qui nous intéressent.

En résumé:

- k_t = mortalité bactérienne totale (pente de la droite C)
- k_{t-m} = mortalité totale sans métazoaires (pente de la droite B)
- k_l = mortalité bactérienne due à la lyse cellulaire (pente de la droite A)
- k_{m+p} = mortalité due au grazing total (pente C - pente A)
- k_m = mortalité due au grazing par le métazooplancton (pente C - pente B)
- k_p = mortalité due au grazing par le protozooplancton (pente B - pente A)

3.3. Etude du protozooplancton

3.3.1. Biomasse

- *Comptages:*

Le dénombrement du nanozooplancton (2 à 20 μm) et du microzooplancton (20 à 200 μm) est effectué par microscopie à épifluorescence après coloration des organismes par un fluorochrome (DAPI, 4'-6 diaminophénylindole). La technique de coloration est identique à celle décrite pour les bactéries.

Les organismes hétérotrophes sont distingués des autotrophes par l'usage de deux combinaisons de filtres d'excitation et d'émissions différents, permettant de visualiser soit l'ensemble des organismes colorés au DAPI (bleu) soit les organismes autotrophes (et mixotrophes) avec présence de chlorophylle a (rouge).

Les échantillons fixés au glutaraldéhyde (0.5% en concentration finale) sont conservés à + 4°C. Pour chaque échantillon, un transect horizontal et vertical permet un comptage sur une surface connue, le calcul d'un facteur de conversion (82,425) pour la surface totale du filtre ainsi que les volumes filtrés (6 ml pour les filtres 0,8 μm et 12 ml pour les 10 μm) permettront les calculs d'abondance. Les organismes sont comptés pour chaque lame (0,8 μm et 10 μm) au grossissement 1000 fois.

- *Biovolume et biomasse:*

Les mesures de largeur (l en μm) et longueur (L en μm) des protozoaires sont effectuées au microscope à épifluorescence à l'aide d'un oculaire portant un réticule gradué et étalonné.

Ainsi le biovolume moyen des protozoaires (V_p , μm^3) est estimé à partir des dimensions de 100 nanoprotozoaires et 50 microprotozoaires assimilés soit à une forme sphérique : $V_p = \pi \cdot l^3/6$, soit ellipsoïdale : $V_p = \pi \cdot L \cdot l^2/6$.

Le diamètre équivalent sphérique (DES) est le diamètre des organismes calculés à partir des biovolumes, $DES = (6V_p/\pi)^{1/3}$. Le diamètre équivalent sphérique permet d'établir les classes de tailles des protozoaires.

Les biovolumes des ciliés et des flagellés sont convertis en biomasse carbonée respectivement par les coefficients de conversion proposés par BEERS & STEWART (1970): $0.08 \text{ pgC}/\mu\text{m}^3$, et de ELDER (1979): $0.10 \text{ pgC}/\mu\text{m}^3$.

Cette partie de calcul de biomasse et biovolume est assurée par Célia Joachim-Justo du laboratoire du Professeur J.-P. Thomé à l'ULg (Ecologie Animale et Ecotoxicologie).

3.3.2. Mesure de l'ingestion de bactéries par la méthode FLB (Fluorescently Labelled Bacteria)

L'emploi de bactéries FLB (Fluorescently Labelled Bacteria) développé par SHERR *et al.* (1987b, 1988) est appliquée aux estimations de taux d'ingestion des bactéries par les protozoaires (grazing). Ainsi les bactéries colorées par un fluorochrome, bactéries FLB, sont visualisées directement, par microscopie à épifluorescence, au sein des protozoaires, après ingestion par ces derniers.

- **Principe de la méthode:**

Cette méthode consiste à inoculer un échantillon naturel avec des bactéries FLB (en concentration trace à savoir environ 10 % de la concentration totale en bactéries de l'échantillon mesurée au préalable au microscope à épifluorescence), et suivre au cours du temps le nombre de FLB ingérées par les protozoaires.

Afin d'éviter l'interférence du processus de digestion des bactéries avec le processus d'ingestion, le taux d'ingestion des FLB par protozoaires par heure, est estimé sur des temps courts (10 à 60 minutes suivant les organismes).

- **Préparation de FLB:**

Après filtration du milieu naturel sur un filtre $2.0 \mu\text{m}$ Nuclepore en polycarbonate (pour éliminer les protozoaires), on ensemence le filtrat avec de l'extrait de levure (200 mg/l) à température ambiante. Après 12 heures d'incubation, les bactéries sont alors concentrées par centrifugation à 20000 g (Centrifugeuse: Sigma 3VK12) durant 15 minutes, à 4°C . Le culot bactérien est alors remis en suspension dans 10 ml de solution saline d'hydrogénophosphate de sodium 0.05 M (Na_2HPO_4 -0.85% NaCl).

Les concentrations finales en bactéries doivent être comprises entre 10^8 et 10^{10} bactéries/ml.

Ainsi préparées, les bactéries sont colorées selon le protocole établi par SHERR *et al.* (1987) avec 0.2 mg/ml de 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl) aminofluoresceine (DTAF), pendant 2 heures à 60°C. La coloration est suivie de trois lavages par centrifugation avec la solution saline d'hydrogénophosphate de sodium. Les bactéries colorées sont alors conservées dans une solution saline de tétrasodium diphosphate 0.02 M ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -0.85% NaCl stérile).

- Estimation du taux d'ingestion:

Le milieu naturel (250 ml), auquel est additionné une aliquote de FLB, est incubé à température *in situ* pendant 1 heure. Durant cette heure 5 aliquotes de 10 ml sont prélevés et fixées avec 10ml de glutaraldéhyde 4 % (concentration finale 2 %). Les aliquotes sont prélevés à 0, 5, 15, 30 et 60 min.

Un volume de 6 et 12 ml de chaque échantillon (20 ml) ainsi fixé à différents temps d'incubation, est conservé à + 4°C, au noir ou immédiatement filtré sur une membrane black respectivement de porosité 0.8 et 10 μm , puis coloré par une solution de DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$). Ces filtres seront posés sur lames et observés au microscope à épifluorescence (1000x). Le filtre 0,8 μm servira au comptage des flagellés alors que le filtre 10 μm ne retiendra que les plus gros protozoaires: les ciliés.

Pour l'aliquote T0, on filtre en plus 0.5 ml sur filtre noir 0.2 μm . Cette filtration, suivie par un comptage de bactéries totales, a pour but de vérifier le rapport entre bactéries marquées (FLB) et bactéries non-marquées.

A chaque prélèvement, le nombre de bactéries FLB au sein de plus ou moins 100 protozoaires est mesuré et porté en graphique en fonction du temps (figure 19).

Bactéries ingérées/ Protozoaire

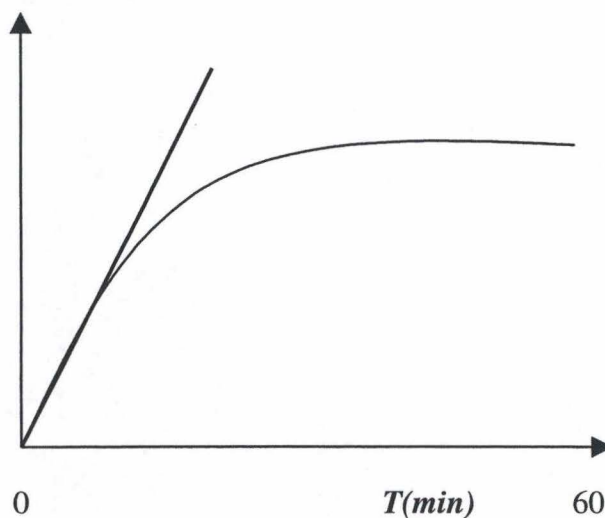


Fig. 19: Evolution de l'ingestion moyenne de bactéries FLB par protozoaire, sur 1 heure.

Ce graphique montre que l'ingestion, après un certain temps, diminue pour devenir stationnaire. Cela se produit lorsque l'ingestion de FLBs est égale à la digestion de FLBs. Après un certain temps, on peut même observé une diminution de l'ingestion, signe que les FLBs commencent à se faire rare dans le milieu. La pente de la droite lorsque l'ingestion est croissante nous permet de mesurer un nombre de bactéries ingérées par protozoaire et par heure.

Afin d'éviter l'interférence du processus de digestion des bactéries avec le processus d'ingestion, le taux d'ingestion des bactéries FLB par les protozoaires par heure, I_{FLB} , est estimé sur des temps courts (5 à 60 minutes selon les organismes) et est obtenu par le calcul de la pente à l'origine de la relation de la figure 19. Le taux d'ingestion des bactéries I est calculé par la relation suivante qui prend en compte le rapport entre l'abondance des bactéries autochtones (N_{aut}) et l'abondance des FLB ajoutés (N_{FLB}):

$$I = I_{FLB} (N_{FLB} + N_{aut}) / N_{FLB}$$

4. Mise au point méthodologique

4.1. Utilisation d'un colorant vital

- *Les fluorochromes:*

La coloration des bactéries se fait classiquement avec du DTAF : (5-[4,6dichlorotriazin-2yl] aminofluorescéine). Ce colorant se fixant par lien peptidique aux protéines contenues dans les bactéries est dit non-vital, ce qui signifie que les bactéries marquées que l'on ajoute pour mesurer l'ingestion sont des bactéries mortes. Or nous savons que les bactéries marquées mortes sont moins ingérées par les protozoaires que les bactéries vivantes (LANDRY *et al.* 1991; MONGER and LANDRY, 1992, GONZALEZ *et al.* 1993). On décide donc de mesurer l'ingestion par la méthode FLB en utilisant différents colorants vitaux et non-vitaux.

Les colorants vitaux ne sont pas nombreux et d'une manière générale donnent un moins bon marquage fluorescent que les colorant non-vitaux :

Le CMFDA (5-Chlorométhylfluorescéine diacétate) est un colorant vital des bactéries. Permettant de détecter une activité estérasique (LI *et al.* 1996), il colore les membranes bactériennes et est piégé dans les cellules car métabolisé en un produit conjugable à un thiol présent dans la membrane pour au moins 72 heures. Cependant, ce composé s'est, après essais (LAMARRE, 2000), révélé inapproprié au marquage des bactéries pour les mesures de broutage. La couleur des bactéries marquées (verte) coïncide avec la couleur verte induite par la fixation du protozooplancton par le glutaraldéhyde, ce qui rend difficile l'énumération de petites bactéries ingérées par le protozooplancton.

Le CTC (Cyanoditolyl Tetrazolium Chloride) colore les bactéries en rouge grâce à l'apparition d'un sel tétrazolium qui est réduit par la chaîne respiratoire. La préparation de FLB marquées au CTC a été optimisée : 1 heures d'incubation à 20°C en présence de 2.5 mM de CTC (LAMARRE, 2000). C'est ce colorant qui sera utilisé.

- *Estimation du taux d'ingestion*

Pour l'expérience d'ingestion proprement dite, on conserve le même protocole que pour l'ingestion de FLB marquées au DTAF si ce n'est le fait qu'elle doit être réalisée directement après la préparation des FLBs.

Toute la difficulté réside, en fait, dans le caractère éphémère du marquage fluorescent de bactéries avec du CTC. Ainsi, la préparation des FLBs (CTC), l'expérience d'ingestion et même le comptage des bactéries marqués et ingérées doivent être réalisés dans les délais les plus courts. Pour la préparation de FLBs (CTC), il faudra aussi veiller, avant de passer à la coloration proprement dite, à avoir un rapport optimum entre les bactéries qui respirent et la totalité de la communauté bactérienne. Les colorants vitaux conviennent mieux aux conditions plus "nettes" des milieux de cultures.

4.2. Comparaison de fixateurs de protozoaires

Cette année, le glutaraldéhyde a été choisi par défaut pour la fixation des protozoaires dans un souci de standardisation de mes protocoles avec ceux utilisés par C. Joachim-Justo pour les calculs de la biomasse des protozoaires. Cependant, en 1996, les résultats d'ingestion obtenus par F. Vandeveldé provenaient de comptages effectués sur des lames dont les protozoaires avaient été fixés avec du lugol alcalin. Des lors, pour pouvoir comparer nos résultats avec les siens, il nous faudra aussi comparer l'influence des différents fixateurs sur les communautés de protozoaires.

Quatre fixateurs ou ensemble de fixateurs classiquement utilisés pour conserver des protozoaires en milieux aquatiques ont été utilisés pour fixer un échantillon d'eau de la Meuse (Tailfer, 20/07/01). Ces fixateurs sont les suivants:

- Le glutaraldéhyde est un fixateur commun pour préserver les échantillons des milieux aquatiques. Le glutaraldéhyde (4 %) dilué avec de l'eau filtrée sur un filtre Nuclepore de porosité de 0.2 μm est mélangé volume à volume avec l'échantillon.

- Le formaldéhyde (37 %) tamponné avec du sodium tétraborate (borax) afin de minimiser la variation du pH dans l'échantillon a également été proposé. Cette solution est ajoutée à l'échantillon afin d'obtenir une concentration finale de 2 %.

- Une solution de lugol acide est classiquement utilisée pour fixer du phytoplancton. Le désavantage du lugol est la coloration des organismes et qui nécessite donc une décoloration préalable par du thiosulfate. Le lugol acide (I_2 10g, KI 20 g, glutaraldéhyde 1 %, H_2O distillée 140 ml), 1 % en concentration finale, est décoloré par 20 μl de sodium thiosulfate 3 % (3 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans 100 ml d'eau milli-Q).

- Une solution combinant lugol alcalin, formaldéhyde et thiosulfate a également été proposée (Sherr et al. 1988). Le lugol alcalin, 0.5% en concentration finale, (I_2 10g, KI 20 g, CH_3COONa 10g, H_2O distillée 140 ml), est décoloré par une solution de formaldéhyde tamponnée par du borate, 3% en concentration finale (6 à 7% de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, dans du formaldéhyde à 35%) et par 20 μl de sodium thiosulfate 3 % (3 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans 100 ml d'eau milli-Q).

Pour les quatre fixateurs, nous comparerons des mesures d'abondance pour qualifier la capacité de fixation de ces différents produits. Pour le glutaraldéhyde et le lugol alcalin, des expériences d'ingestion de bactéries FLB seront réalisées en vue de confronter les comptages de bactéries visibles dans les vacuoles digestives des protozoaires.

*RÉSULTATS
&
DISCUSSION*

1. Paramètres physico-chimiques

1.1. Débit et température

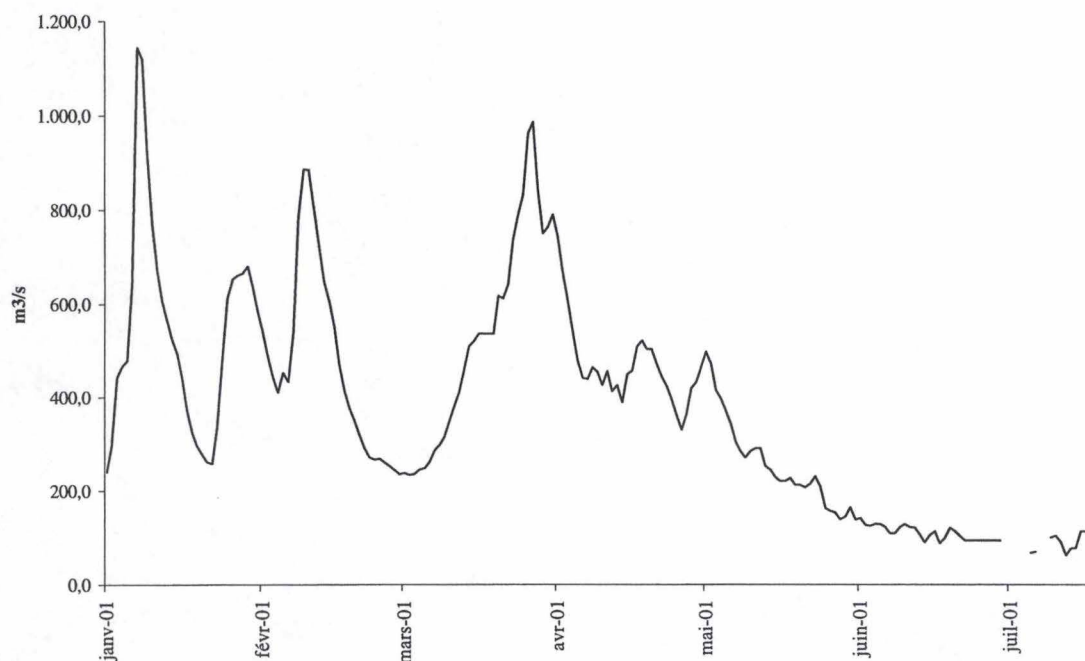


Fig. 20: Débit ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) mesuré de façon journalière pour la Meuse à Tailfer. Données de la Compagnie Intercommunale Bruxelloise des Eaux (CIBE).

Cette année, le débit de la Meuse est resté particulièrement élevé jusqu'en mai, ceci étant la conséquence de la persistance de fortes précipitations en mars et avril. D'ailleurs, les stations météorologiques n'avaient plus enregistré d'aussi fortes précipitations pour le mois d'avril depuis 1903.

Normalement, la Meuse connaît, selon la saison, des variations de son débit avec une période de hautes eaux en hiver et une période de basses eaux en été, c'est une rivière à régime pluvial des régions tempérées de type océanique. A Tailfer, la moyenne annuelle avoisine $200 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$. Pour l'année 2001, on peut voir que les débits restent longtemps élevés et probablement qu'en fin d'année, on calculera un débit annuel moyen supérieur à la moyenne.

Pour les températures, c'est à partir du moi de mai que l'on n'enregistre plus de valeurs en dessous de 10°C . Les conditions climatiques du moi d'avril n'ont pas permis à la Meuse de se réchauffer plus tôt.

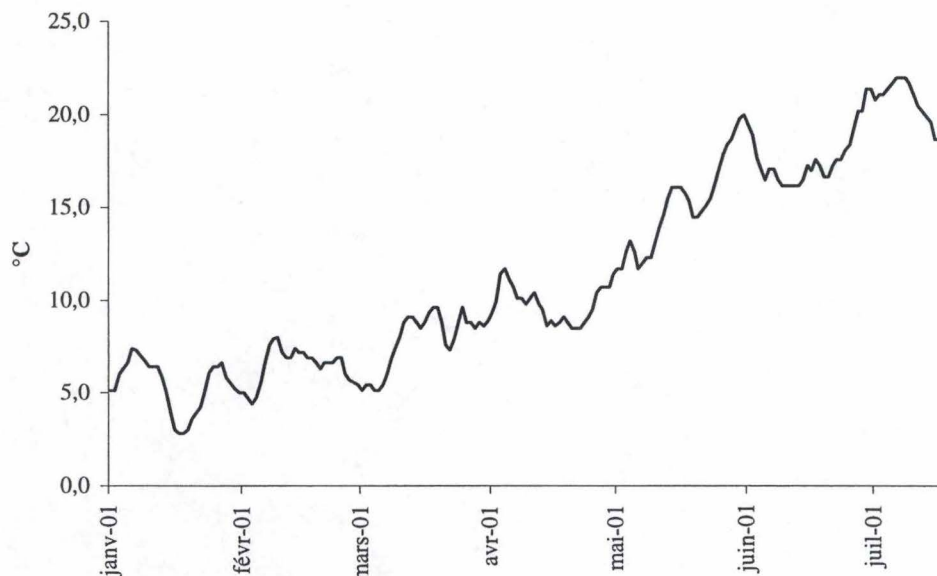


Fig. 21: Evolution des températures pour la Meuse à Tailfer pour l'année 2001
Données de la Compagnie Intercommunale Bruxelloise des Eaux (CIBE).

Les conditions de faibles températures et surtout le maintien d'un débit élevé jusque tard dans la saison n'ont pas été favorable au développement des organismes planctoniques. Les concentrations de plancton étant restées faibles, nous n'avons pu commencer l'étude des interactions entre les différents compartiments planctoniques qu'à partir de mai.

1.2. Oxygène dissous

Les concentrations en oxygène dissous sont relativement élevées et s'étalent entre 9,5 et 13,6 mg $O_2.l^{-1}$, ce qui semble indiquer que la rivière ne présente pas de problèmes d'oxygénation. Au contraire, ces valeurs correspondent à une légère sursaturation caractéristique d'un secteur autotrophe (voir production primaire).

1.3. pH et alcalinité

Les eaux de la Meuse se caractérisent par une alcalinité élevée avec des valeurs oscillant entre 34,2 et 38,5 mg de carbone inorganique par litre, principalement sous forme de bicarbonates. En effet, le pH de l'eau est alcalin, il varie peu entre 8,1 et 8,4. L'eau est calcaire et bien minéralisée, ce qui s'explique par la nature carbonatée des roches pour toute une partie bassin versant.

1.4. Nutriments

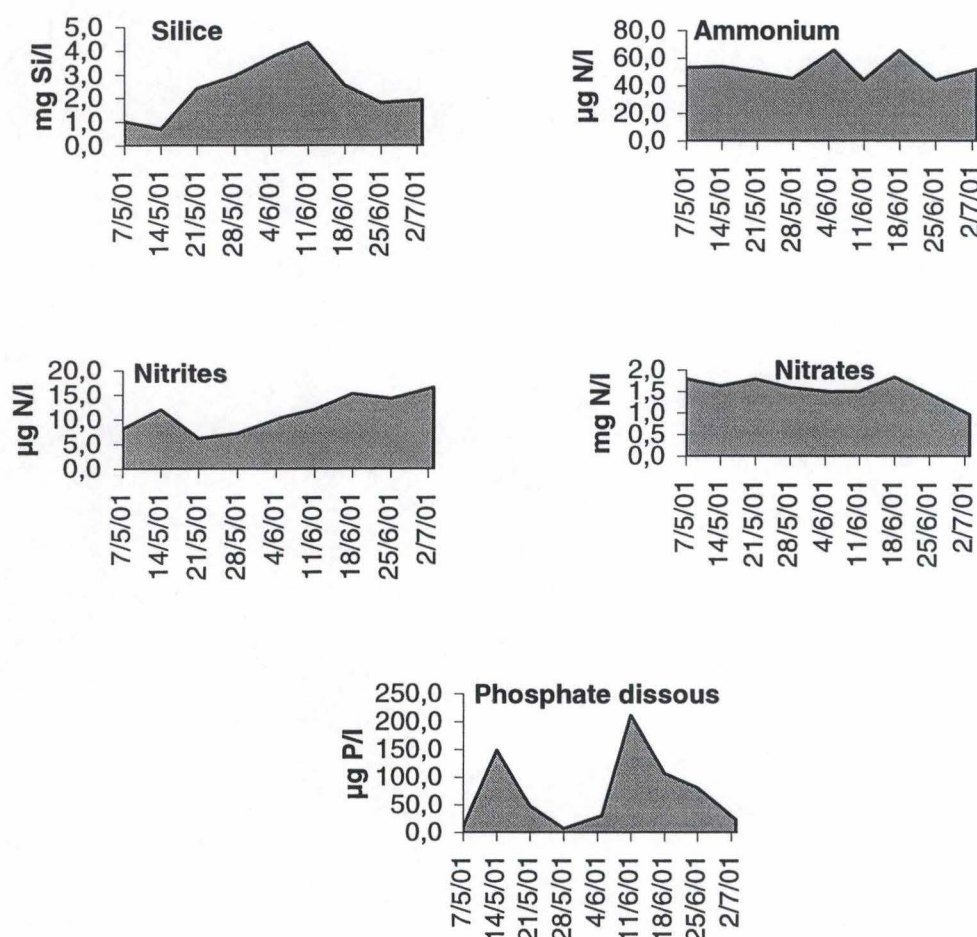


Fig. 22: Evolution des concentrations en nutriments pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Les concentrations en nutriment N, P et Si sont susceptibles de limiter la production primaire dans de nombreux milieux aquatiques. Cependant, la Meuse est une grande rivière de type eutrophe, elle reçoit les eaux de drainage de son large bassin versant utilisé par l'homme pour l'agriculture, ainsi que les eaux usées des habitants vivant sur ce bassin versant. Les apports en nutriments sont donc importants et ne limitent généralement pas la croissance algale même s'il arrive que l'on enregistre des concentrations potentiellement limitantes pour certaines algues (ex: des concentrations en dessous de 10 $\mu\text{g P/l}$ seraient limitantes pour *Cyclotella*, *Stephanodiscus*, *Chlorella*, ...), il faut tenir compte des variations spatio-temporelles en nutriments et du fait que les stocks intracellulaires, généralement bien remplis, n'ont pas le temps d'être épuisés. En Meuse, il peut arriver que les concentrations en silice deviennent limitantes pour le développement des diatomées surtout lors de blooms importants (EVERBECK *et al.*, 2001), ce ne fut pas le cas cette année.

2. Suivi des communautés planctoniques

D'abord prévues toutes les deux semaines à partir de la mi-mars, le début des campagnes d'étude de la Meuse à Tailfer a dû être plusieurs fois postposé pour les raisons évoquées plus haut. Vers la fin avril, les débits ont chuté et nous avons commencé les campagnes le lundi 7 mai. Pour obtenir un nombre raisonnable de points de mesure, il a été décidé de réaliser une campagne chaque semaine jusqu'au début de l'été.

2.1. Le Phytoplancton

2.1.1. Biomasse phytoplanctonique

Les biomasses phytoplanctoniques ont été estimées d'après le dosage de la chlorophylle *a* présente dans un échantillon d'eau brute. La mesure a été effectuée 12 fois entre le 7 mai et le 3 juillet.

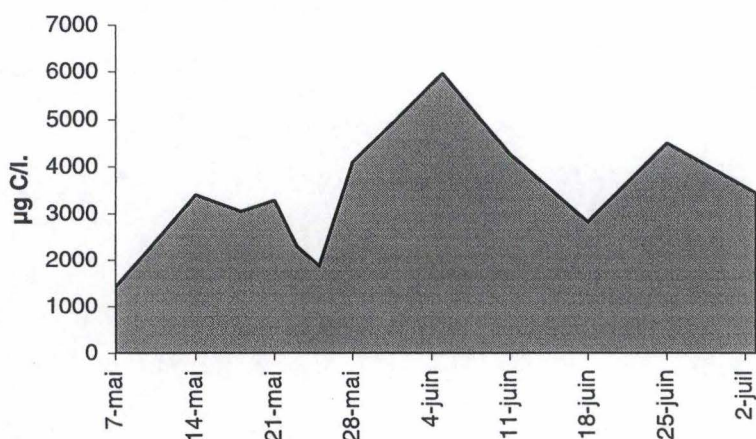


Fig. 23: Evolution de la biomasse phytoplanctonique, estimée d'après la concentration en chlorophylle *a*, pour la Meuse à Tailfer, entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Sur la Fig. 23, on peut voir la biomasse totale qui varie entre 1,41 mg C.l.⁻¹ le 7 mai et 5,96 mg C.l.⁻¹ le 4 juin. L'année passée, un pic avait été observé un peu plus tôt entre le 11 et le 25 mai avec un maximum de 3,5 mgC.l.⁻¹. Nous n'essayerons pas de caractériser la saison 2001 mais on peut quand même dire que pour les mois de mai et juin, cette année présente des biomasses phytoplanctoniques en général plus élevées que pour l'année 2000.

Pour ce qui concerne les classes d'algues, déterminées d'après l'analyse des pigments en HPLC, on voit très clairement sur la Fig. 24 que ce sont les diatomées qui dominent la communauté phytoplanctonique avec une moyenne de 81 % de la biomasse totale. Cela était déjà le cas en 2000 où elles représentaient en moyenne 85 % de la biomasse algale... Nous n'irons pas plus loin dans l'analyse des biomasses phytoplanctoniques.

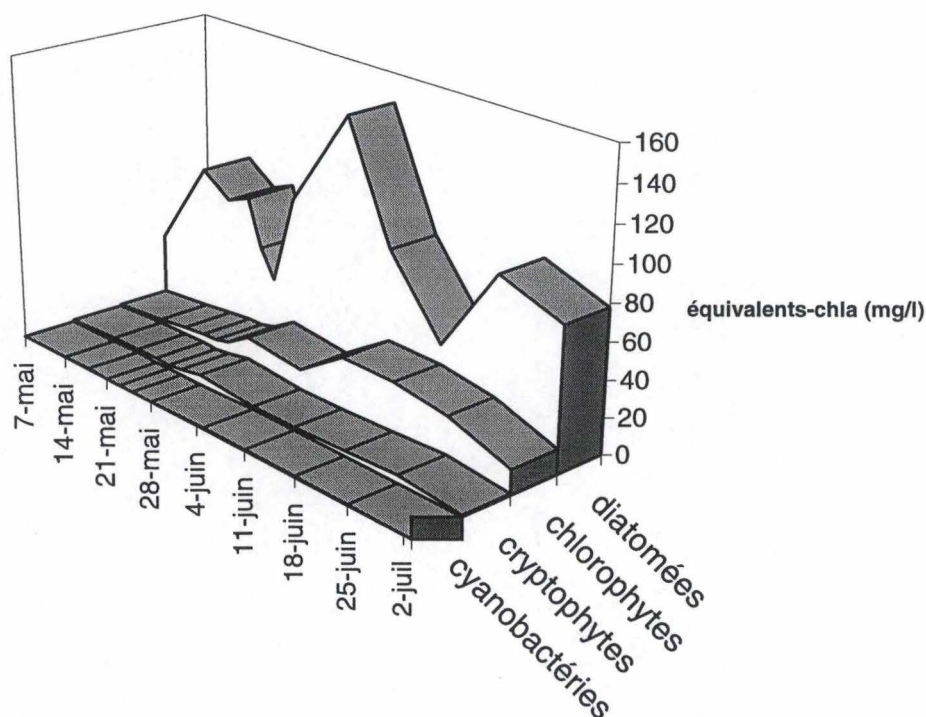


Fig. 24: Evolution des 4 grandes classes d'algues présentes pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.
Les biomasses sont exprimées en équivalents-chlorophylle *a* calculés par le programme CHEMTAX sur base des concentrations en pigments marqueurs.

2.1.2. Production primaire

La production brute journalière du phytoplancton oscille entre 1,68 et 4,53 g C.m⁻².j⁻¹. De ces valeurs, on peut calculer une production primaire nette en soustrayant la respiration qui vaut en moyenne 47,3 % de la production totale.

Les valeurs de production brute sont comprises dans la gamme rapportée par Gosselain (1998) pour l'année 1996.

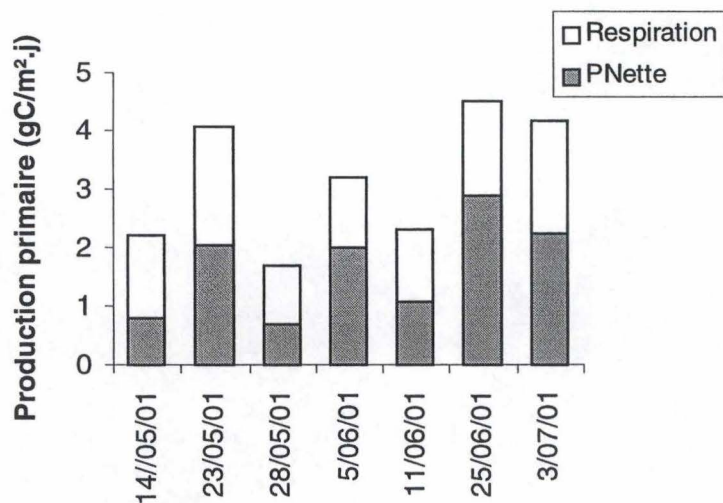


Fig. 25: Evolution de la production primaire totale (Prod. Prim. nette + respiration) pour la Meuse à Tailfer entre le 14 mai et le 3 juillet 2001.

Cette production primaire nette (variant entre 0,7 et 2,9 g C.m⁻².j⁻¹) pourra être comparée à la production bactérienne pour observer une éventuelle corrélation.

2.2. Le Bactérioplancton

2.2.1. Biomasse bactérienne

Les comptages ont été effectués en microscopie à épifluorescence entre le 7 mai et le 3 juillet. Une initiation à la reconnaissance et aux comptages bactériens a été réalisée durant les mois précédant le suivi des communautés.

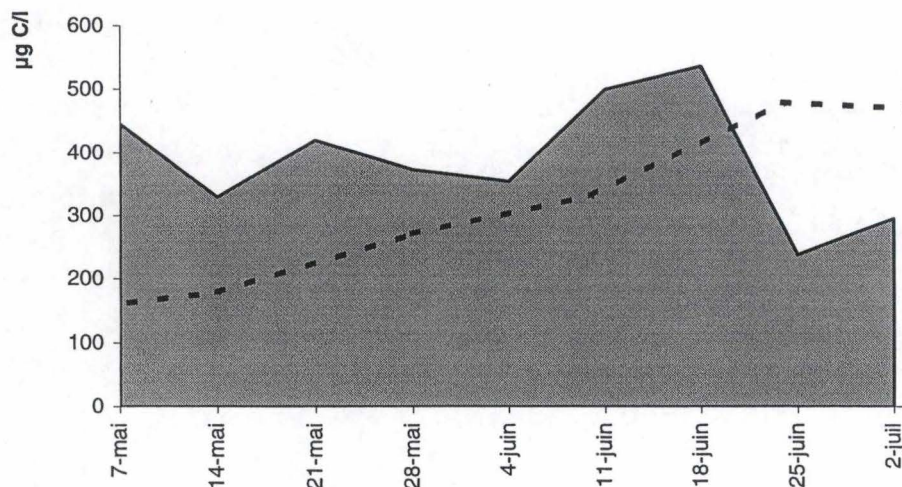


Fig. 26: Evolution de la biomasse bactérienne pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001. (en pointillés le biomasse bactérienne pour mai et juin 1996).

Les biomasses ont été calculées à partir d'un facteur de conversion appliqué aux abondances, à défaut d'avoir pu calculer notre propre facteur de conversion (par manque de temps), nous avons repris la valeur moyenne (22.96 fg C/bactérie) observée pour l'année 2000. Sur toute l'année 2000, ce facteur de conversion a fluctué entre 17,83 et 29,54 fg C/bact. Pour la période du 7 mai au 3 juillet, on pourra considérer que la variation de la taille moyenne, et donc la quantité de carbone contenu dans une cellule, pour les bactéries, est faible surtout pendant ces deux mois.

Il serait hasardeux de vouloir caractériser l'année 2001 dans sa globalité car nous ne disposons ni des minimas hivernaux, ni des pics estivaux. On dispose quand même d'une mesure de biomasse bactérienne effectuée le 14 mars avec 85 $\mu\text{g C/l}$.

En général, les mois de mai et juin présentent habituellement une augmentation progressive des biomasses bactériennes, souvent corrélée avec les biomasses phytoplanctoniques, pour atteindre les sommets autour de 600 $\mu\text{g C/l}$. (SERVAIS *et al.* 2000) en juillet. Entre mai et juillet 2001, on a mesuré des biomasses bactériennes allant de 239 à 537 $\mu\text{g C.l}^{-1}$. On peut voir, en comparant avec la Fig. 23, que le pic de biomasse bactérienne suit un premier pic de biomasse phytoplanctonique causé par un bloom de diatomées. La biomasse bactérienne peut quand même varier fort d'une année à l'autre. En 2000, la plus haute valeur de biomasse était de 261 $\mu\text{g C.l}^{-1}$, alors que cette année, si les résultats restent dans des normes acceptables, il faut bien reconnaître que les valeurs obtenues sont toutes assez élevées, flirtant régulièrement avec les maximas des autres années alors que l'on qualifie cette saison comme tardive. Ces valeurs pourront être corrigées, s'il y a lieu, par l'établissement d'un facteur de conversion propre à la période de mai-juillet 2001.

2.2.2. Production bactérienne

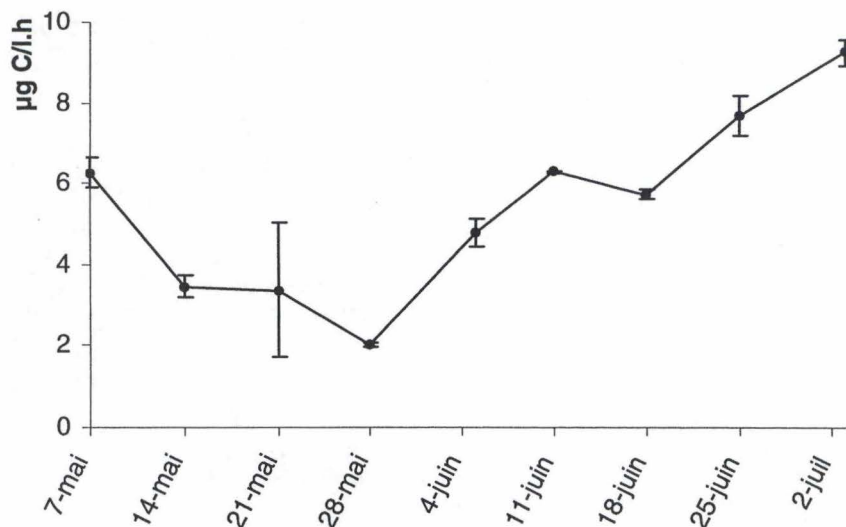


Fig. 27: Evolution de la production bactérienne pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

La production bactérienne à été mesurée chaque semaine suivant la technique de marquage du matériel génétique par l'incorporation de ³H-thymidine. D'une manière générale, on voit clairement que la production bactérienne augmente progressivement avec le temps, en passant par un plancher de 2 µg C.l⁻¹.h⁻¹ le 28 mai, elle atteint un maximum le 3 juillet avec 9,2 µg C.l⁻¹.h⁻¹.

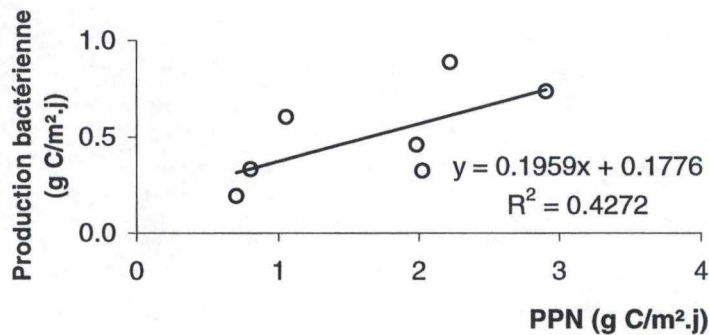


Fig. 28: Corrélation entre la production primaire nette et la production bactérienne (g C.m⁻².j⁻¹).

Sur la Fig. 28, on examine la corrélation entre la production bactérienne et la production primaire qui n'est pas vraiment bonne. Cela s'explique par le fait que la comparaison se fait sur des mesures ponctuelles et de courtes périodes. A cette échelle, il existe souvent un retard (de quelques jours) entre la production primaire et la production bactérienne. Une meilleure corrélation sera observée avec des valeurs moyenne collectées sur de plus longues périodes.

D'après les mesures de production bactérienne, on a calculé un taux de croissance en h⁻¹. Pour ce faire, il suffit de diviser la production bactérienne (µg C.l⁻¹.h⁻¹) par la biomasse bactérienne (µg C.l⁻¹).

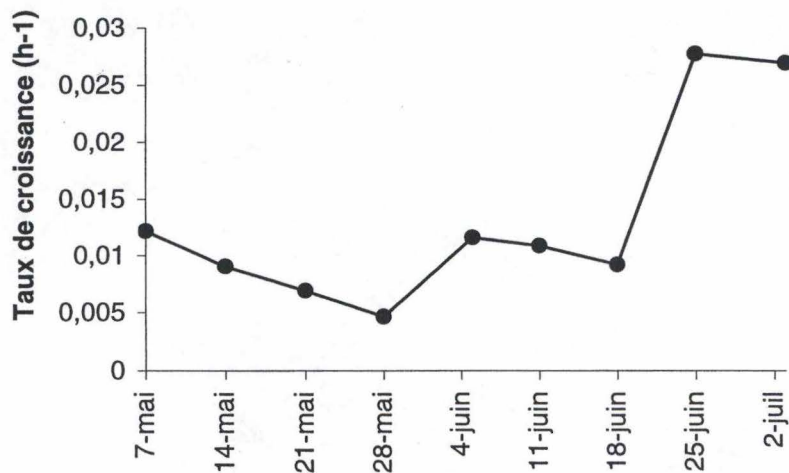


Fig. 29: Evolution du taux de croissance bactérien pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Les valeurs des taux de croissance mesurées pour les différents échantillons fluctuent entre 0.004 et 0.029 h^{-1} , ces données sont proches de celles mesurées en 1996 pour la Meuse (entre 0.005 et 0.020 h^{-1}). Ces valeurs correspondent à des temps de génération ($g = \ln 2/\mu$) compris entre 25 et 150 heures.

La valeur maximale du taux de croissance est observée fin-juin lorsque la température atteint les 20°C . Les valeurs de taux de croissance trouvées dans cette étude sont au centre de la gamme des valeurs mentionnées par Billen *et al.* (1988 in VANDEVELDE, 1996) entre 0.001 et 0.1 h^{-1} pour des environnements aquatiques très divers.

2.3. Le protozooplancton

2.3.1. Abondances et biomasses

Des comptages de protozoaires ont été effectués, au microscope à épifluorescence, pour chaque semaine entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

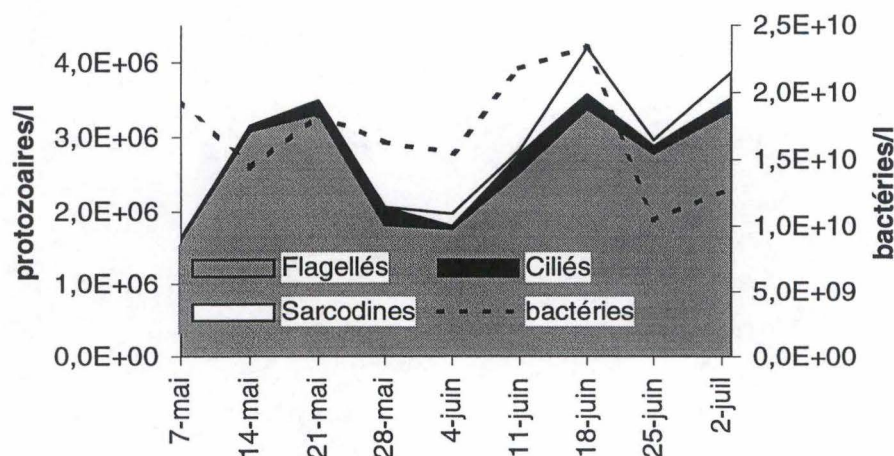


Fig. 30: Evolution des abondances des bactéries (---) et des protozoaires pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Sur la Fig. 30, on voit clairement que les abondances de protozoaires évoluent en parallèle avec les abondances de bactéries, elles covarient, dans le sens où lorsque le nombre de bactéries diminue, le nombre de protozoaires diminue et inversement. En 1996, on comptabilisait des abondances en protozoaires variant entre $1,0 \cdot 10^6$ et $3,3 \cdot 10^6$ protozoaires par litre. Cette année encore, nous nous trouvons dans le même ordre de grandeur avec des fluctuations entre $1,6 \cdot 10^6$ et $4,2 \cdot 10^6$ protozoaires par litre. Notons aussi que l'abondance de protozoaires est constituée à 90,2 % de flagellés.

Il aurait été meilleur de comparer les bactéries et les protozoaires par leur biomasse respective. Sans doute aurions nous pu mettre en évidence une meilleure relation. Les mesures de biomasse pour les protozoaires ne peuvent se faire via un seul facteur de conversion appliqué à l'abondance. En effet, les quantités de carbone par individu peuvent fluctuer très fort d'une espèce à l'autre. Sachant que d'une semaine à l'autre la composition spécifique au sein des protozoaires peut varier du tout au tout, il faut, chaque semaine répéter des comptages assortis de mesures de biovolumes pour obtenir des biomasses. Ceux-ci ont été faits pour le programme F.R.F.C. mais à raison d'une mesure toutes les deux semaines. Au moment de la rédaction, nous ne disposons pas encore d'assez de résultats pour pouvoir les comparer avec les biomasses bactériennes.

2.4. Le métazooplancton

Parmi le gros métazooplancton, on retrouve les rotifères et des microcrustacés. Les rotifères représentent en moyenne 98,9 % du métazooplancton

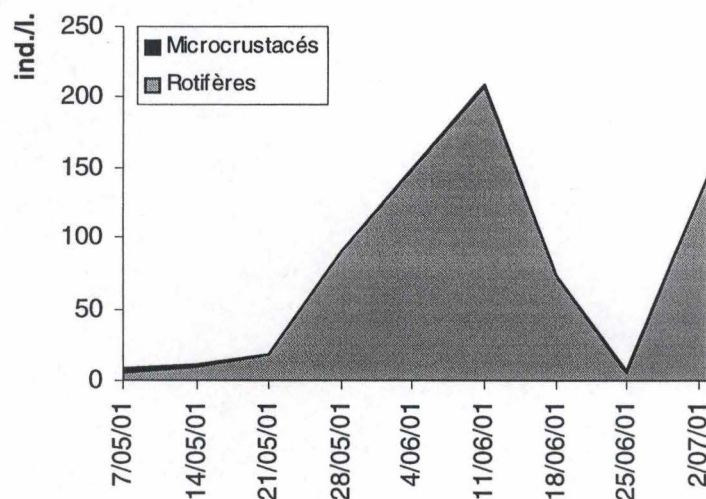


Fig. 31: Evolution du métazooplancton pour la Meuse pour la Meuse à Tailfer en 2001.

L'abondance fluctue entre 6,7 et 208,7 individus par litre. La communauté se compose essentiellement des espèces de rotifères habituelles de la Haute Meuse. C'est *Keratella cochlearis* qui domine, cette année, la population de rotifères avec 69 % du total (Fig. 32). En 1996, Viroux a étudié une communauté de métazooplancton dont déjà *Keratella cochlearis* dominait constamment avec près de 60 % des effectifs totaux.

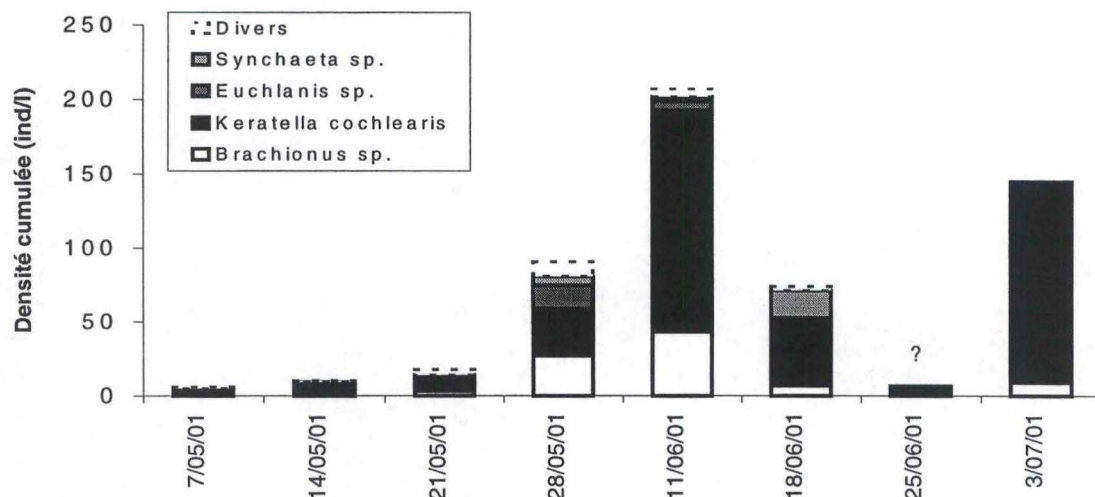


Fig. 32: Evolution des différentes espèces de rotifères pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

3. Mortalité bactérienne, grazing par le protozooplancton

3.1. Mortalité bactérienne

La mortalité bactérienne a été mesurée chaque semaine à partir du 7 mai selon la méthode de suivi de la décroissance du marquage radioactif de l'ADN bactérien.

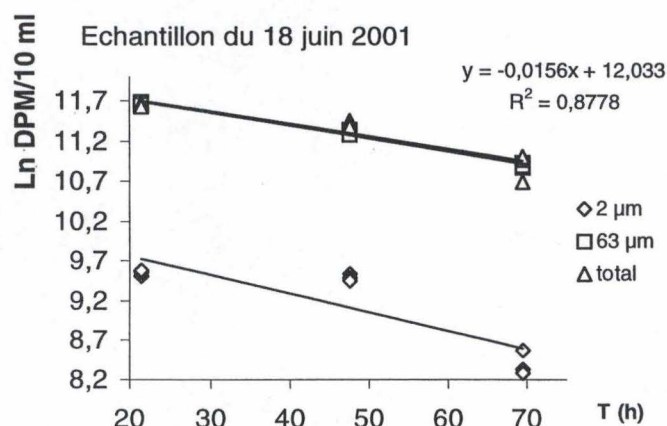


Fig. 33: Exemple de décroissance de la radioactivité dans la fraction insoluble au TCA froid pour un échantillon d'eau de Meuse (18/06/01) après incorporation de ^3H -thymidine (To correspond en fait à 24 heures après l'inoculation de thymidine tritiée).

Les autres résultats bruts de suivi de la décroissance de radioactivité sont présentés en annexes (cfr. Taux de mortalité bactérienne). Les coefficients de variation restent toujours faibles pour les échantillons effectués en triplicats, sauf quelques fois où un point se retrouve très éloigné des deux autres, celui-ci est alors exclu de la régression.

Les mesures ont été effectuées en triplicats à partir du mois de juin. Pour le mois de mai, on ne pouvait expliquer l'écart des points par rapport à une régression linéaire comme étant la conséquence d'une mauvaise mesure: l'erreur expérimentale; ou bien d'un problème de linéarité de la mortalité dû par exemple à des fluctuations de populations de brouteurs au sein des échantillons. En effet, l'échantillon, au cours du suivi de la décroissance de marquage peut voir ses populations évoluer différemment que dans la nature, il faudrait donc vérifier ces populations en faisant des comptages avant et en fin d'expérience.

Les calculs des taux de mortalité totale, par lyse et par grazing on été effectués comme expliqué dans la partie matériel et méthodes (3.2.2.).

Sur la figure suivante, on peut voir l'importance qu'occupe le broutage dans les processus de mortalité. Nous avons pu aussi rendre la part de broutage qui revenait aux protozoaires, le reste étant attribué aux métazoaires. Rappelons que la distinction protozoaire/métazoaire, dans cette expérience, se fait suivant une discrimination de la taille et non de la morphologie. On considère les individus inférieurs à $63\ \mu\text{m}$ comme protozoaires et les autres comme métazoaires; il existe donc un risque d'avoir quelques gros ciliés chez les métazoaires.

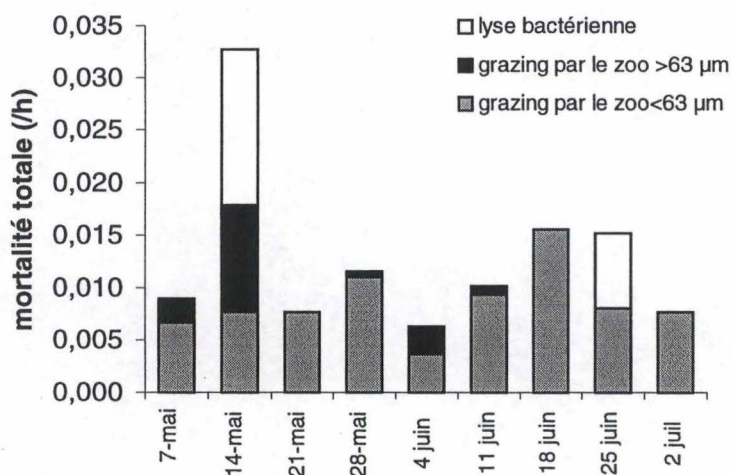


Fig. 34: Evolution de la mortalité bactérienne pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001 (une campagne chaque semaine).

La mortalité totale fluctue entre $0,007$ et $0,032\ \text{h}^{-1}$ pour le 14 mai, date où l'on enregistrait justement de fortes abondances de protozoaires et une diminution de biomasse bactérienne. Ces valeurs sont du même ordre qu'en 1996 ou dans la littérature: Servais *et al.* en 1992 propose un tableau récapitulatif des taux de mortalité dans les milieux d'eau douce, lacustres et marins. Pour la Meuse, il nous renseigne des valeurs de mortalité totale (k_t) de $0,006$ à $0,024\ \text{h}^{-1}$.

La valeur élevée du 14 mai serait, même si il y un broutage conséquent par du zooplancton $>63 \mu\text{m}$ (probablement des gros ciliés puisqu'il n'y a pas de rotifères (Fig.31), essentiellement due à la lyse bactérienne (sous le terme lyse bactérienne, on entend ici la mort naturelle, par attaque virale,...). En effet, la pente de la droite correspondant à l'échantillon filtré sur $2 \mu\text{m}$ (ou aucun prédateur n'est présent) était de $-0,0148$ alors que les autres semaines, la pente de cette droite est proche de 0. Encore une fois, les données de mai doivent être considérées prudemment étant donné le fait que les mesures n'ont pas été réalisées en triplicats.

La Fig. 34 montre que c'est le grazing (broutage) par le protozooplancton qui est la principale cause de mortalité bactérienne: de 23,5 à 100 % pour une moyenne de 77% de la mortalité est due au grazing par les protozoaires. Les 21 mai, 18 juin et 2 juillet ont peut voir que le grazing par les protozoaires est responsable de 100 % de la mortalité bactérienne.

Les valeurs de taux de mortalité augmentent d'une manière générale (sans tenir compte du deuxième point) au cours de la période étudiée, ceci est à mettre en relation à la fois avec un accroissement de la température et avec une augmentation de la population de protozoaires brouteurs de bactéries qui entraîne un accroissement du broutage.

Les taux de mortalité peuvent être utilement comparés aux valeurs de taux de croissance (Fig. 35).

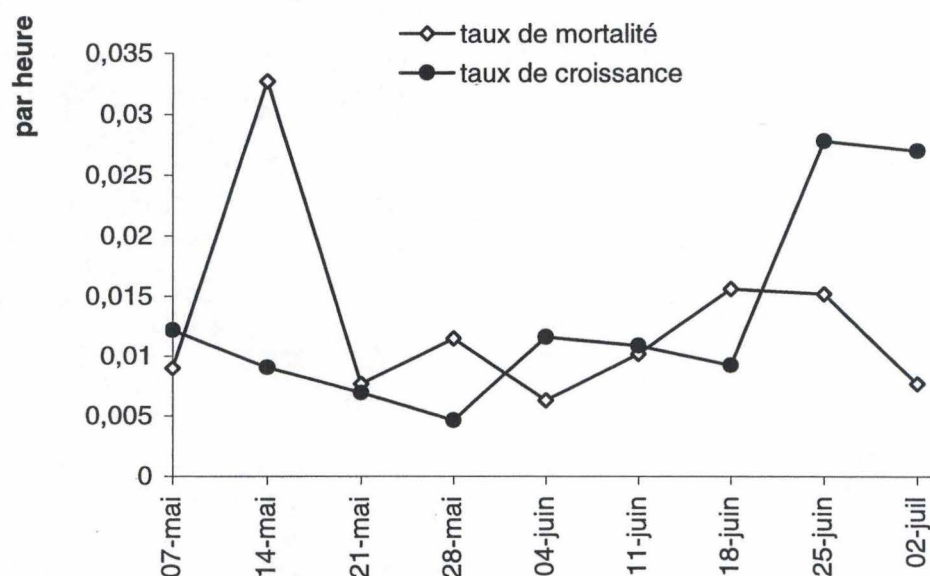


Fig. 35: Evolution du taux de croissance et du taux de mortalité bactérienne pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Logiquement, on considère qu'une population bactérienne se trouvant à l'état stationnaire (biomasse carbonée constante) résulte d'un équilibre parfait entre le taux de mortalité et le taux de croissance. Donc, en observant la Fig. 35 ci-dessus, on pourrait s'attendre à une chute de biomasse bactérienne lorsque la mortalité dépasse la croissance et inversement... Pour le 14 mai, nous avons sans doute surestimé la mortalité bactérienne et ce probablement par une erreur d'estimation de la lyse bactérienne.

3.2. Activité de broutage (grazing) par les protozoaires, estimée par la méthode FLB

La méthode d'ingestion de bactéries marquées par un fluorochrome (FLB) nous a permis de calculer des nombres moyens de bactéries ingérées par protozoaire, cela pour chaque campagne entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

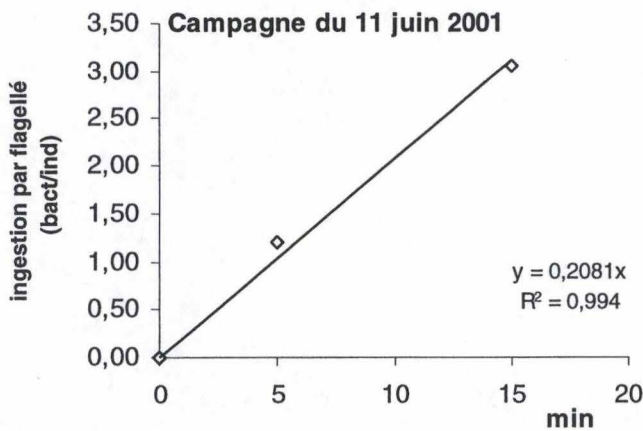


Fig. 36: Exemple de cinétique d'ingestion de bactéries par les flagellés pour la campagne du 11 juin 2001 (rem: seules les trois premières mesures présentent une cinétique linéaire, les points à 30 et 60 min. se situent déjà dans la zone de saturation (cfr. Matériel et méthodes).

Etant donné que des mesures d'abondance, nous renseignant sur les nombres de protozoaires par litres d'eau de Meuse, ont été réalisées, on peut calculer une ingestion de bactéries par les protozoaires en nombre de bactéries par litre et par heure.

Tableau 1: Activité d'ingestion de bactéries par les protozoaires pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

	FLAGELLES		CILIES		SARCODINES	
	Bact/Proto.h.	Bact/l.h.	Bact/Proto.h.	Bact/l.h.	Bact/Proto.h.	Bact/l.h.
7-mai	32,3	52326687	109,9	3018898	0,0	0
14-mai	19,4	59654599	278,3	22941680	0,0	0
21-mai	28,2	93455839	14,8	2524513	0,0	0
28-mai	51,2	92883414	105,2	26002450	0,0	0
4-juin	61,2	107550778	46,5	1916381	0,0	0
11-juin	12,5	31560862	26,7	6609661	0,5	26376
18-juin	42,0	142037233	11,2	2155579	0,0	0
25-juin	31,7	87861258	10,3	1136806	0,0	0
3-juil	12,8	42878144	8,3	1361002	0,0	0

L'ingestion totale de bactéries par les protozoaires varie entre 3,82 10⁷ et 14,42 10⁷ bactéries par litre et par heure. L'avantage de la méthode FLB, c'est qu'elle nous permet, à l'intérieur du compartiment protozoaires, de faire la distinction entre flagellés, ciliés et sarcodines.

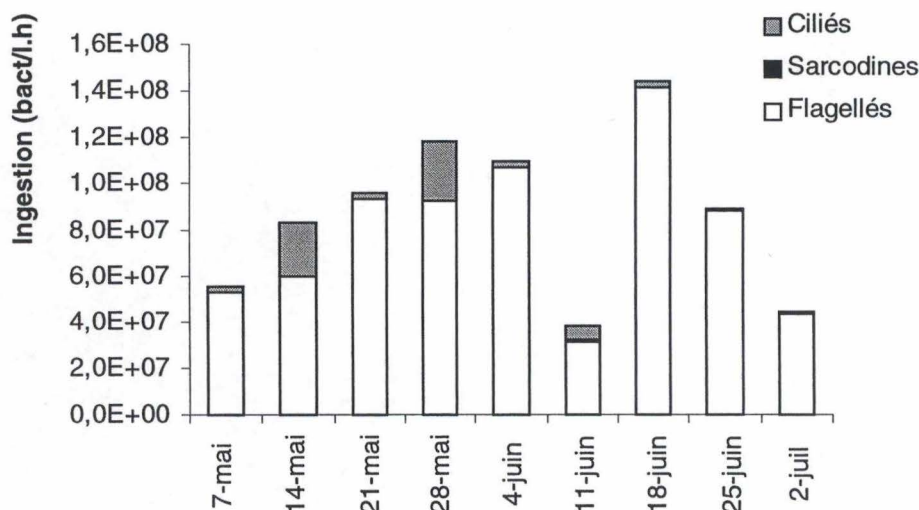
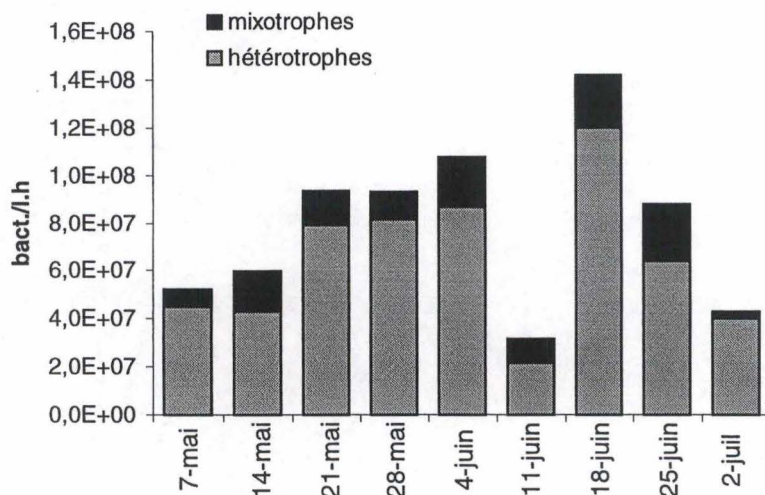


Fig. 37: Evolution de l'ingestion de bactéries par les protozoaires, par la méthode FLB, pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

La Fig. 37 montre clairement que ce sont les flagellés qui jouent le rôle le plus important dans les phénomènes d'ingestion avec un pic de $14,20 \cdot 10^7$ bactéries ingérées par litre et par heure le 18 juin 2001. Soulignons aussi la faible mesure d'ingestion pour les flagellés lors de la campagne du 11 juin (à partir de la campagne 6).

La microscopie à épifluorescence offre l'avantage de permettre, par distinction des organismes ayant ingérés des bactéries et présentant aussi des chloroplastes, de faire la différence entre les organismes hétérotrophes et mixotrophes. Cette année, aussi bien pour les ciliés que pour les flagellés, ce sont les organismes hétérotrophes qui ont eu le plus d'influence sur les communautés bactériennes avec en moyenne, pour les neufs campagnes, 80,9 % de l'ingestion par les flagellés qui est attribuée aux flagellés hétérotrophes ainsi que 62 % pour les ciliés hétérotrophes.

ingestion de bactéries par les flagellés



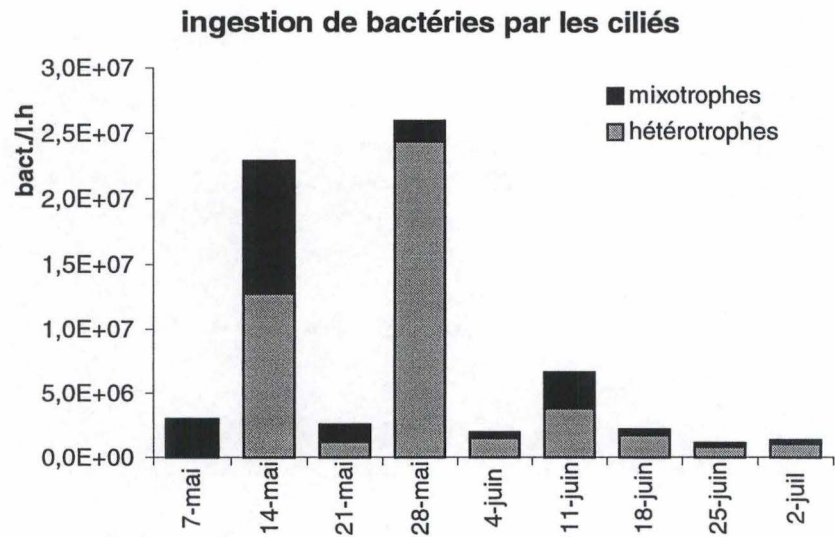


Fig. 38: Evolution des proportions hétérotrophie/mixotrophie en termes d'ingestion pour les flagellés et les ciliés pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

Finalement, en divisant les résultats d'ingestion ($\text{bact.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), par les biomasses bactériennes (bact.l^{-1}) calculées chaque semaine, on obtient un taux de broutage en h^{-1} que l'on va pouvoir comparer au taux de mortalité bactérienne due au grazing (broutage) par les protozoaires avec la méthode basée sur la décroissance de l'activité thymidine tritiée.

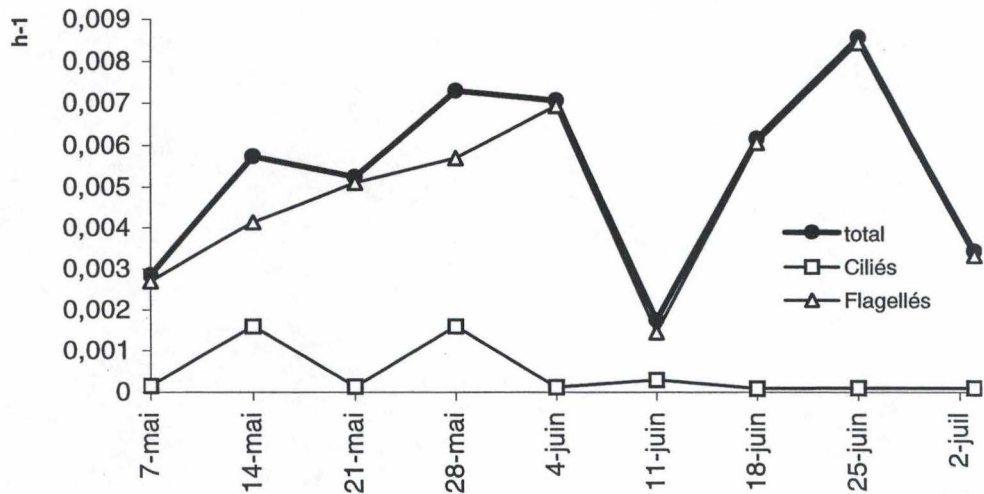


Fig. 39 : Evolution des taux de broutage de bactéries par les protozoaires, mesuré par la méthode FLB pour la Meuse à Tailfer entre le 7 mai et le 3 juillet 2001.

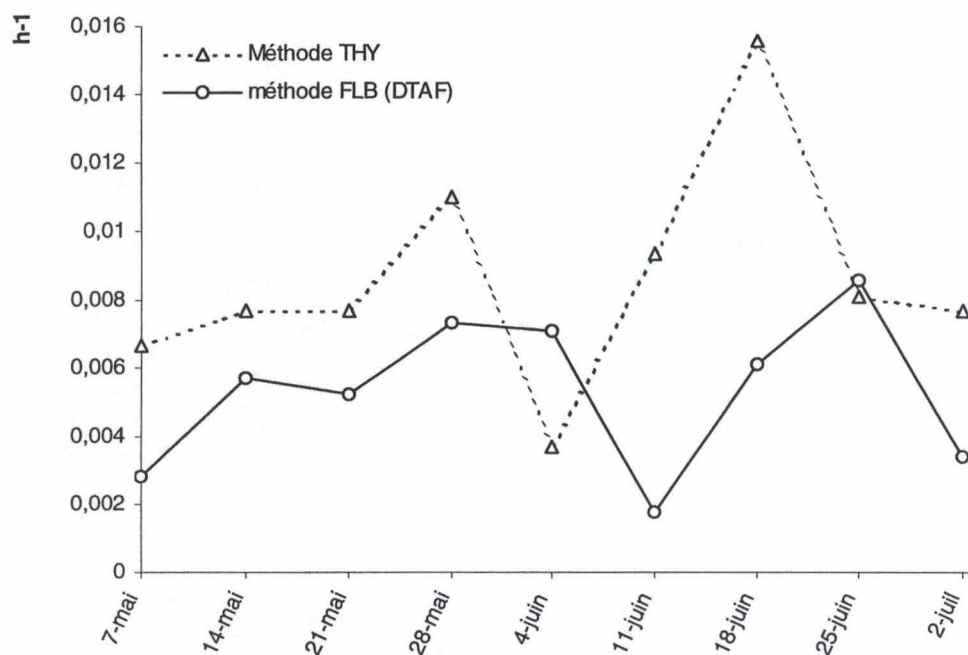


Fig. 40: Comparaison entre les taux de mortalité bactériens due au grazing par le protozooplancton obtenus suivant les deux méthodes en 2001.

Les taux d'ingestion des bactéries mesurées par la méthode basée sur l'ingestion de bactéries fluorescentes ne montrent une bonne corrélation avec les valeurs estimées à partir de l'incorporation de thymidine tritiée, malgré une évolution similaire. L'augmentation des taux d'ingestion observés au début du mois de juin avec la méthode à la thymidine tritiée ne sont pas bien observés par la méthode basée sur l'ingestion de bactéries fluorescentes.

L'examen des rapports entre taux de mortalité obtenus par la méthode à la thymidine sur ceux obtenus par la méthode FLB nous renseigne des valeurs entre 0,5 et 5,3 avec une moyenne de 2,0. Les déviations maximales étaient obtenues à partir du mois de juin. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ces différences:

Les FLB (DTAF) sont des bactéries colorées et mortes au contraire des bactéries marquées à la thymidine tritiée. Il est donc possible qu'une sélection alimentaire préférentielle existe pour les bactéries vivantes. SERVAIS *et al.* (2000) pour l'année 1996, présentaient des valeurs de taux de mortalité mesurés par méthode FLB, en utilisant du DTAF, en moyenne déjà 32 % inférieures aux taux mesurés par la méthode thymidine (ce qui correspond à un rapport THY/FLB = 1,5). Si les résultats obtenus par la méthode FLB étaient inférieurs, ils étaient néanmoins bien corrélés à ceux obtenus par l'autre technique de mesure ($r^2 = 0,97$).

Epstein et Rossel (1995) proposent d'utiliser un colorant vital pour marquer les FLB. Un colorant vital, le CTC, a été choisi pour comparer l'influence des marquages vitaux et non-vitaux. Cependant, la mise au point méthodologique s'est étalée en longueurs et n'a pas permis de réaliser la comparaison des ingestions de FLB marquées par du DTAF ou du CTC dans les temps qui nous étaient impartis.

Aussi, l'observation au microscope des bactéries fluorescentes (FLB) ingérées par les protozoaires nécessite la fixation au préalable des protozoaires. Aucun fixateur jusqu'à présent permet la fixation optimale de l'ensemble des protozoaires. Le fixateur pourrait intervenir sur la détermination de l'abondance des protozoaires et sur le nombre de FLB ingérées par protozoaires observées au microscope à épifluorescence. Une expérience a été réalisée pour étudier les effets de l'utilisation d'un fixateur sur un autre dans l'estimation de l'ingestion des bactéries par les protozoaires (voir mises au point méthodologiques).

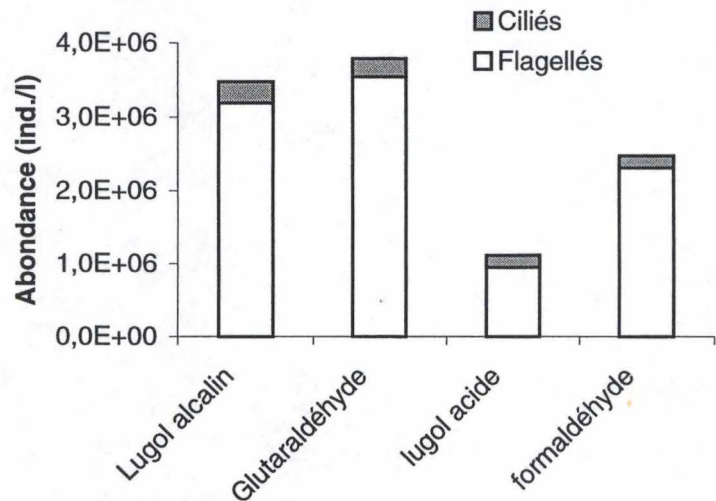


Fig. 41: Comparaison des valeurs d'abondance obtenues en utilisant quatre fixateurs de protozoaires différents pour un échantillon d'eau de Meuse.

Très nettement, c'est la fixation des protozoaires avec du lugol acide qui nous donne les moins bon résultats, surtout pour les abondances de flagellés. Ce fixateur ne permet pas, en fait, de détecter les plus petits des flagellés (les HNF < 5µm) qui par ailleurs sont les plus abondants pour les périodes étudiées. Le lugol alcalin et le glutaraldéhyde donnent des résultats comparables avec une meilleure efficacité pour le second. Néanmoins, l'observation détaillée nous renseigne que cette efficacité n'est valable que pour les flagellés. En effet, les abondances de ciliés valant $2,9 \cdot 10^5$ ciliés par litre en utilisant du lugol alcalin chutent à $2,5 \cdot 10^5$ ciliés par litre lorsqu'on utilise le glutaraldéhyde. En termes de biomasse, les écarts se creuseront encore plus puisque les ciliés sont les plus gros des protozoaires.

Nous avons aussi testé, dans une expérience d'ingestion de FLB, les deux meilleurs fixateurs de protozoaires pour mettre en évidence une éventuelle influence sur le phénomène de grazing de bactéries par les protozoaires.

Tableau 2: Mesure de l'ingestion de bactéries par les protozoaires (bact./ind.h) pour deux types de fixateurs: le lugol alcalin et le glutaraldéhyde.

	Flagellés	Ciliés
Lugol alcalin	6,0	29,6
Glutaraldéhyde	5,7	26,1

Les ciliés fixés au glutaraldéhyde fluorescent plus dans le vert que les ciliés fixés au lugol alcalin. Cette fluorescence verte interfère un peu lors du repérage des bactéries marquées au DTAF et qui se trouvent dans les vacuoles digestives.

4. Flux de carbone

Pour ce qui concerne les apports de carbone au compartiment bactérien, la principale source pour les bactéries de la Meuse est le carbone provenant du phytoplancton (par lyse, excrétion et sloppy feeding). Ces données peuvent être comparées à la DBC (demande bactérienne en carbone). La DBC correspond à la fraction de carbone qui est utilisée pour faire de la biomasse. Pour 1 g de carbone assimilé par les bactéries hétérotrophes, 0,3 g vont se retrouver sous forme de biomasse bactérienne et 0,7 g seront relargués sous forme de CO₂ par respiration.

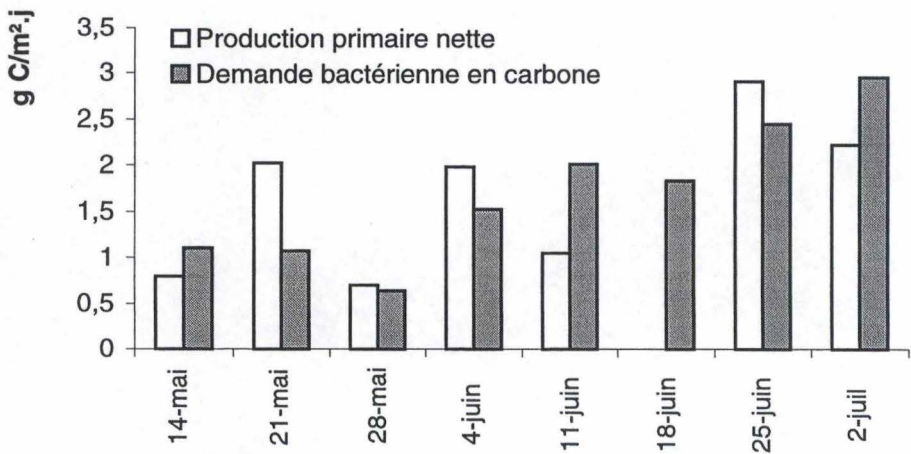


Fig. 42: Comparaison entre la production primaire nette et la demande bactérienne en carbone pour la Meuse à Tailfer entre le 14 mai et le 3 juillet 2001.

Cette année, la DBC (calculée à partir de la production bactérienne) est très élevée par rapport aux autres années où les valeurs de DBC se situent généralement entre 0,5 et 1 g C.m⁻².j⁻¹. Habituellement, La DBC représente en moyenne 50 % de la production primaire nette pour la Meuse, en moyenne sur la saison de croissance du plancton. Sur la figure 42, on peut voir qu'il arrive que la DBC dépasse même cette production primaire nette. Il y a eu soit une sur-estimation de la DBC, ou sous-estimation de la production primaire nette. Une troisième possibilité serait de voir dans ces résultats le signe d'un apport allochtone satisfaisant cette demande bactérienne en carbone. On pourrait alors se lancer dans une discussion sur la validité de la valeur moyenne de 0,375 g C.m⁻².j⁻¹ (estimée par PEGASE, cfr. Synthèse bibliographique 3.1.1.) de flux de carbone allochtone destiné aux bactéries.

Pour ce qui concerne les flux de carbone provenant du compartiment bactérien, la mesure de la mortalité bactérienne par la méthode à la thymidine tritiée nous permet d'évaluer le rôle des processus impliqués en termes de flux de carbone. Si on exclu la deuxième série de mesures (en italique), qui donnent des valeurs incertaines que l'on ne peut vérifier faute de triplicats, on peut estimer les flux de carbone destinés aux compartiments des prédateurs de bactéries.

Tableau 3: Flux de carbone provenant du compartiment bactérien, transit vers les autres compartiments (g C.m⁻².j⁻¹).

	protozoaires	métazoaires	lyse	mortalité bact
7-mai	0,33	0,11	0,00	0,45
14-mai	0,28	0,37	0,54	1,20
21-mai	0,36	0,00	0,00	0,36
28-mai	0,46	0,02	0,00	0,48
4-juin	0,15	0,10	0,00	0,25
11-juin	0,52	0,05	0,00	0,57
18-juin	0,93	0,00	0,00	0,93
25-juin	0,21	0,00	0,19	0,40
2-juil	0,25	0,00	0,00	0,25
Moyenne	0,40	0,04	0,02	0,46

Pour la période du 7 mai au 3 juillet 2001, la communauté bactérienne a perdu, en moyenne 0,46 g de carbone pour une colonne d'eau d'un mètre carré de surface (sur 4 mètres de profondeur en moyenne) et par jour pour la Meuse à Tailfer. De ces 0,46 g de carbone, 0,40 g ont été ingéré par des protozoaires (zooplancton <63 µm) et 0,04 g par des métazoaires (zooplancton >63 µm). 0,02 g de carbone sont retournés au pool de carbone organique dissous (COD) de la Meuse et, ainsi, de nouveau disponible pour les bactéries.

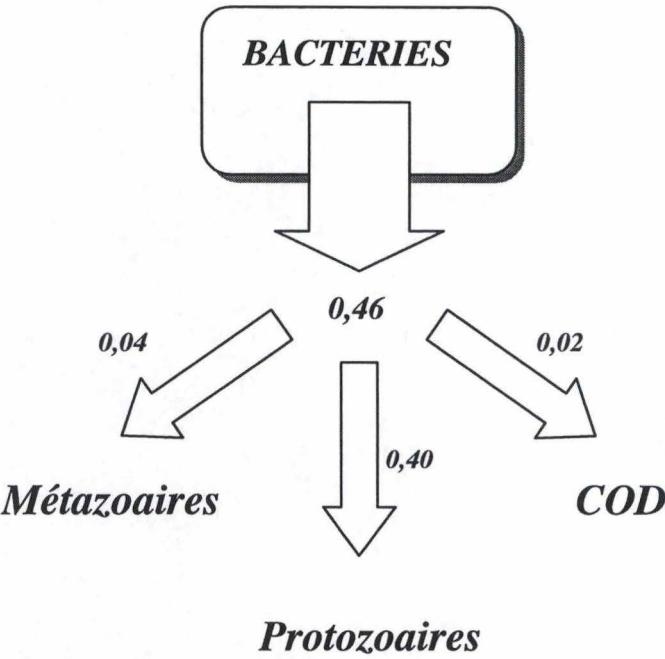


Fig. 43 : Devenir du carbone provenant des bactéries d'après les flux moyen calculés pour la période du 7 mai au 3 juillet 2001 ($\text{g C. m}^{-2}.\text{j}^{-1}$).

*CONCLUSION
&
PERSPECTIVES*

Tout au long de ce travail, nous avons réalisé un suivi des communautés planctoniques en Haute Meuse belge pour le site de Tailfer. Dans le cadre d'une évaluation de l'importance de la boucle microbienne, nous nous sommes appliqués à l'étude de la mortalité bactérienne en utilisant deux techniques complémentaires.

Cette année, entre le 7 mai et le 3 juillet, nous avons étudié une communauté bactérienne qui, en terme de biomasse, était importante par rapport aux années précédentes. Aussi, nous avons pu constater des valeurs de DBC (demande bactérienne en carbone) élevées tout au long du suivi. Ces valeurs ont d'ailleurs plusieurs fois dépassé les résultats de production primaire nette. Les bactéries ont semble-t-il joué, cette année, un grand rôle de reminéralisateur. En effet, on sait que 70 % du carbone organique dissous utilisé par les bactéries sert à la respiration et termine donc en carbone inorganique sous forme de CO_2 . Donc, si la production bactérienne a été élevée cette année, la reminéralisation du carbone l'a été aussi avec en moyenne $1,18 \text{ g C.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ de carbone inorganique retransformé.

Par la méthode de suivi de la décroissance de marquage du matériel génétique bactérien préalablement marqué par de la thymidine tritiée, on a déterminé une mortalité bactérienne, dont le grazing (broutage) par le zooplancton inférieur à $63 \mu\text{m}$, principalement constitué de protozoaires, constitue la principale cause de mortalité. Cette mortalité due au grazing par les protozoaires a représenté en moyenne 77 % de la mortalité totale des bactéries hétérotrophes de la Meuse dans le secteur étudié.

Cependant, on pourrait supposer qu'il s'agit là, peut-être, d'une surestimation due à une évolution différentes des protozoaires pour l'échantillon étudié que si elle s'était déroulée dans la nature. En effet, les prédateurs de bactéries dans l'échantillon subissent moins l'influence de leurs propres prédateurs, une partie de ceux-ci ayant été éliminé par une filtration sur filtre de porosité $63 \mu\text{m}$. Les protozoaires pourraient donc, en fin de semaine, être plus nombreux pour un même volume d'eau que s'ils étaient resté en Meuse, accroissant ainsi la mortalité bactérienne. Néanmoins, les taux de mortalité sont du même ordre de grandeur que les taux de croissance (Fig. 35) et donc, si surestimation, il y a, elle reste faible. De plus, comme elle est répétée chaque semaine, elle n'a donc pas de réelle influence sur l'évolution générale, en valeurs absolues, du taux de mortalité.

D'après les flux de carbone calculés à partir des mesures de mortalité par la méthode thymidine tritiée, on a pu déterminer un bilan général (Fig. 44) pour quantifier l'importance de la boucle microbienne grâce à une collaboration avec Sébastien Antoine pour la mesure des différents flux de carbone transitant par la boucle microbienne (notamment pour les flux de carbone entre le phytoplancton et le bactérioplancton).

Par la mesure de l'ingestion de bactéries marquées fluorescentes (FLB) par les protozoaires, on peut, en plus de calculer des taux de mortalité bactérienne comparables à ceux obtenus par l'autre méthode, estimer la part de broutage qui est due, à l'intérieur du groupe protozoaires, aux flagellés, aux ciliés et aux sarcodines avec en plus, une distinction possible entre prédateurs hétérotrophes ou mixotrophes.

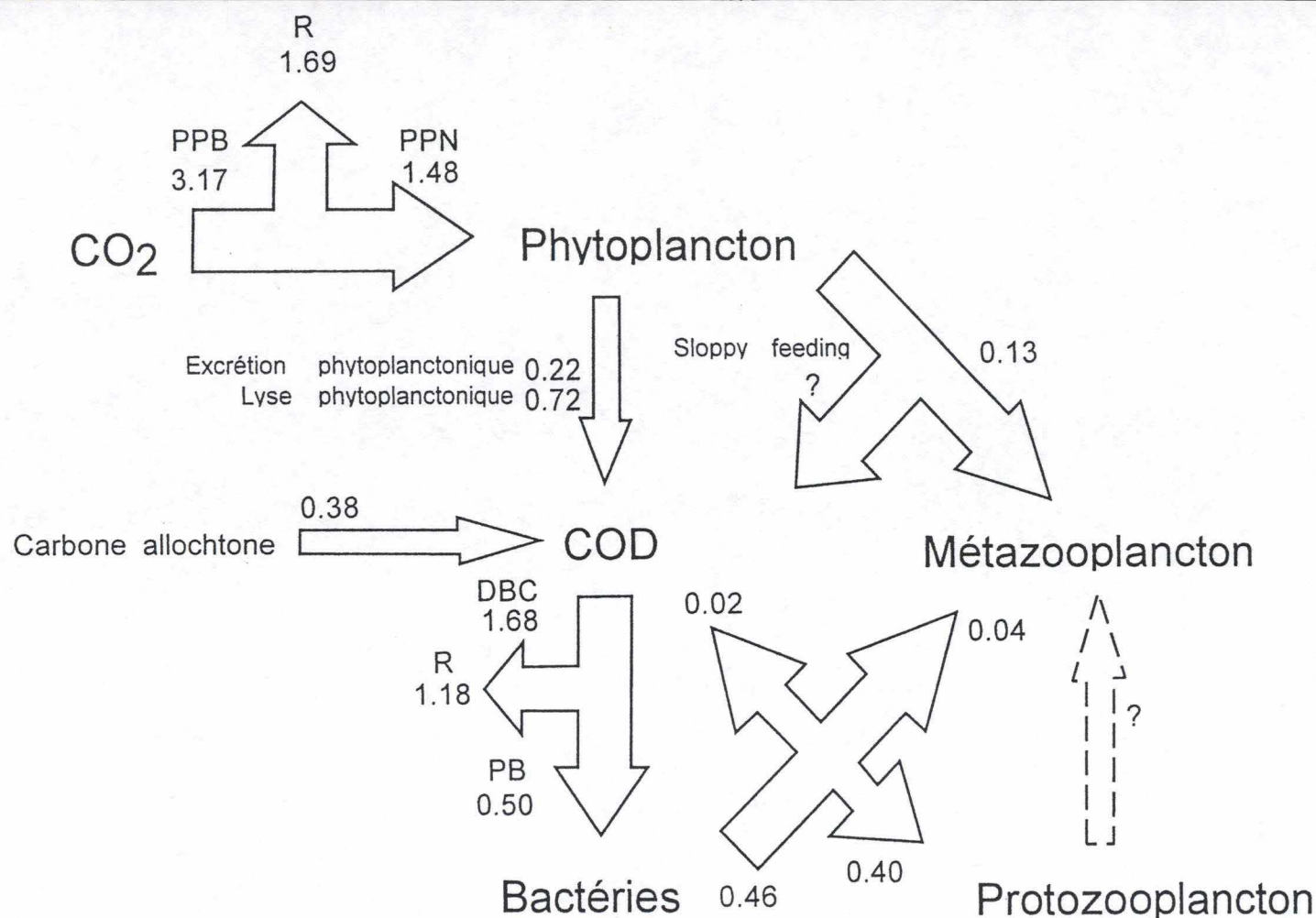
Cependant, les résultats obtenus cette année pour les taux de mortalité ne sont pas corrélés avec les taux de mortalité mesurés par la méthode thymidine tritiée (Fig. 40). L'erreur provient, au moins en partie, d'une sous-estimation des populations de ciliés à cause de l'utilisation de glutaraldéhyde pour la fixation des protozoaires (Fig. 41).

La méthode FLB peut nous apporter des résultats supplémentaires puisque, à l'intérieur même du groupe protozoaires, on peut faire une distinction du broutage par les ciliés, les flagellés et les sarcodines, hétérotrophes ou mixotrophes. Cependant la méthode reste lourde à réaliser de par les nombreuses heures de microscopie nécessaires pour effectuer les comptages. De plus, les calculs pour obtenir les taux d'ingestion de bactéries par les protozoaires demandent aussi la connaissance des données de biomasses de bactéries et de protozoaires, ces données étant aussi obtenues à partir de comptages longs et fastidieux...

Vraisemblablement, la méthode FLB gagnerait beaucoup en efficacité (diminution du temps nécessaire pour réaliser l'expérience et augmentation de la précision des résultats) si on couplait cette méthode avec les techniques modernes de comptages : la cytométrie en flux ou par analyse d'image. Ces techniques récentes permettraient d'effectuer des comptages, au moins pour les calculs de biomasses (VAN WAMBEKE, 1995), dont la précision ne dépendrait plus de l'expérience de celui qui compte. Malheureusement, la mise en œuvre de ces techniques requiert de gros investissements en matériel (cytomètre en flux, caméra numérique haute définition, programme d'analyse d'image,...). Néanmoins, cela permettrait dès lors, d'envisager raisonnablement de multiplier les marqueurs fluorescents de différents types.

On peut aussi envisager l'emploi d'autres techniques pour l'évaluation du grazing de bactéries par les protozoaires. Des approches variées existent, chacune a des avantages spécifiques aussi bien que des faiblesses propres et des ambiguïtés qui empêchent de les appliquer dans toutes les conditions. Certaines de ces méthodes seront considérées, non comme des solutions de remplacement, mais comme de vrais compléments, chacune devant être employée en fonction de ses points forts et chacune contrôlant et appuyant les autres dans les domaines où elles se recoupent. LANDRY (1994) propose un tableau reprenant toutes les méthodes de mesure du grazing par les protistes planctoniques.

Un exemple de méthode développée actuellement est celle du dosage des enzymes, présentent dans les vacuoles des protistes, qui servent à dégrader les peptidoglycanes des parois bactériennes ainsi que la majeure partie des composants procaryotiques. Ces lysozymes sont des glucosaminidases dont les quantités peuvent être évaluées par l'utilisation d'un substrat artificiel dont le produit est fluorescent. (4-méthylbelliferone- β -N-acetylglucosaminidase : MUF)(VBRA *et al.*, 1993 ; GONZALES *et al.*, 1993).



Rem: si le sloppy feeding n'est pas connu, on peut quand même estimer qu'il ne dépasse pas 10 % du broutage du phytoplancton par le métazooplancton

Fig. 44: Bilan global des flux de carbone ($\text{g C/m}^2.\text{j}$) sur la période du 7 mai au 3 juillet 2001 pour la Meuse à Tailfer.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Agusti, S., and Duarte, C. (2000). Strong seasonality in phytoplankton cell lysis in the NW Mediterranean littoral. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 940-947.

Agusti, S., Satta, M. P., Mura, M. P. & Benavent, E. (1998) Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis rates in the northwestern Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1836-1849.

Amblard, C., Boisson, J.C., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X. & Sime-Ngando, T. (1998) Microbial ecology in aquatic systems: a review from viruses to protozoa. *Rev. Sci. Eau*. N° spécial: 145-162.

Arndt, H. (1993) Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates)- a review. *Hydrobiologia.* **255-256**: 231-246.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer, L.A. & Thingstad, F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.

Becquevort, S. (1987) Etude de la prédation des bactéries par les microprotozoaires hétérotrophes en milieux aquatiques. *Mémoire de licence*. Université libre de Bruxelles 77p.

Beers, J. R.& Stewart, G. L. (1970) Numerical abundance and estimated biomass of microzooplankton, in "The ecology of the plankton of La Jolla, California in the period April through September ", Stickland, J. D. R. (Ed.) *Bull Scripps Inst. Ocean.* **17**: 67-87.

Bjørnsen, P. K. (1988) Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.* **33**: 151-154.

Bratbak, G.& Thingstad, T. F. (1985) Phytoplankton-bacteria interaction: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **25**: 23-30.

Caron, D. A. (1983) Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 491-498.

Carrias, J. F., Amblard, C.& Bourdier, G. (1996) Protistan bacterivory in an oligomesotrophic lake: importance of attached ciliates and flagellates. *Microb. Ecol.* **31**: 249-268.

Caufman, F. (2000) Evolution des densités planctoniques en Meuse et mise au point d'une technique d'étude *in situ* des relations trophiques entre le métazooplancton et le protozooplancton en milieu fluvial. *Mémoire de licence*. Université de Liège 55p.

Cole, J. J., Findlay, S. & Pace, M. L. (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43**: 1-10.

Daley, R. J. & Hobbie, J. E. (1977) Direct count of aquatic bacteria by a modified epifluorescent technique. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 875-882.

Descy, J. P., Servais, P., Smits, J. S., Billen, G. & Everbecq, E. (1987) Phytoplankton biomass and production in the river Meuse (Belgium). *Wat. Res.* **21**: 1557-1566.

Descy, J. P. & Gosselain, V. (1994) Development and ecological importance of phytoplankton in a large lowland river (river Meuse Belgium). *Hydrobiol.* **289**: 139-155.

Descy, J. P., Gosselain, V., & Evrard, F. (1994) Respiration and photosynthesis of river phytoplankton. *Verh. Int. Ver. Limnol.* **25**: 1555-1560.

Descy, J. P., Leporcq, B., Viroux, L., François, C. & Servais, P., sous presse. Phytoplankton production, exudation and bacterial reassimilation in the river Meuse (Belgium). *Journal of Plankton Research*.

Elder, L. (1979) Recommendation for marine biological studies in The Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. *Baltic Marine Biologists*. **4,5**: 1-38.

Epstein, S. S. & Rossel, J. (1995) Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **117**: 289-298.

Everbecq, E., Gosselain, V., Viroux, L. & Descy, J.-P. (2001) POTAMON: a dynamic model for predicting phytoplankton composition and biomass in lowland rivers. *Water Research*. **35**(4): 901-912.

François, C. (2000) Etude de la boucle microbienne au sein du plancton fluvial: excrétion phytoplanctonique et réassimilation bactérienne. *Mémoire de licence*. Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix Namur 83p.

Fuhrman, J. A. & Azam, F. (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Colombia Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 1085-1095.

Fuhrman, J. A. & Azam, F. (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* **66**: 109-120.

Gonzales, J. M., Sherr, B. F. & Sherr, E. B. (1993) Digestive enzyme activity as a quantitative measure of protistan grazing: the acid lysozyme assay for bacterivory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **100**: 197-206.

Gosselain, V., Descy, J.-P., Everbecq, E. (1994) The phytoplankton community of the river Meuse, Belgium: Seasonal dynamics (Year 1992) and the possible incidence of zooplankton grazing. *Hydrobiol.* **289**: 179-191.

Gosselain, V. (1998) Phytoplankton de la Meuse et de la Moselle et impact du broutage par le zooplancton. Thèse de doctorat, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 459p.

Gosselain, V., Descy, J.-P., Viroux, L., Joachim-Justo, C., Hammer, A., Métens, A. & Schweitzer, S. (1998) Grazing by large river zooplankton: a key to summer potamoplankton decline? The case of the Meuse and Moselle rivers in 1994 and 1995. *Hydrobiologia*. **369**: 199-216.

Gosselain, V., Viroux, L. & Descy, J.-P. (1998) Can a community of small grazers control phytoplankton in rivers? *Freshwater biology*. **39**: 9-24.

Güde, H. (1988) Direct and indirect influences of crustacean zooplankton on bacterioplankton of the Lake Constance. *Hydrobiologia*. **159**: 63-73.

Hellebust, J. A. (1965) Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 192-206.

Hessen, D. O. (1985) The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in oligotrophic lakes. *FEMS Microb. Ecol.* **31**: 215-223.

Hodson, R. E., Holm-Hansen, O. & Azam, F. (1976) Improved methodology for ATP determination in marine environments. *Mar. Biol.* **34**: 143-149.

Horne & Goldman (1994) Limnology (second edition), McGraw-Hill, New-York, 576p.

Joux, F. & Lebaron, P. (1995) Applications en écologie bactérienne des sondes oligonucléotidiques fluorescentes par les techniques d'hybridation et de cytométrie. *Océanis*. **21**: 125-138.

Jürgens, K. (1994) Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs - A review. *Mar. Microb. Food Webs*. **8**: 295-324.

Kirchman, D., K'Neas, F. & Hodson, R. (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 599-607.

Köhler, J. (1997) Measurement of *in situ* growth rates of phytoplankton under conditions of simulated turbulence. *J. Plankton Res.* **19**: 849-862.

Lamarre, A. (2000) Etude de l'ingestion des bactéries par les protozoaires en milieu aquatique: comparaison de l'ingestion des bactéries marquées avec des colorants vitaux et non-vitaux. *Mémoire de licence*. Université libre de Bruxelles, 37p.

Lancelot, C. (1983) Factors affecting phytoplankton extracellular release in the Southern Bight of the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **12**: 179-186.

Landry, M. R. (1994) methods and controls for measuring the grazing impact of planktonic protists. *Marine Microbial Food Webs*. **8** : 37-57.

Landry, M. R., Lehner-Fournier, J. M., Sundstrom, J. A., Fagerness, V. L. & Selph, K. E. (1991) Discrimination between living and heat-killed prey by a marine zooflagellate, *Paraphysomonas vestita* (Stokes). *J. Exp. mar. Biol. Ecol.* **146**: 139-151.

Leakey, R. J. G., Burkill, P. H. & Sleight, M. A. (1994) A comparison of fixatives for the estimation of abundance and biovolume of marine planktonic ciliate populations. *J. Plankton Res.* **16**: 375-389.

Li, A., Stoecker, D. K., Coats, D. W. & Adam, E. J. (1996) Ingestion of fluorescently labeled and phycoerythrin-containing prey by mixotrophic dinoflagellates. *Aquat. Microb. Ecol.* **10** : 139-147.

Mackey, M. D., Mackey, D. J., Higgins, H. W. & Wright, S. W. (1996) CHEMTAX - a program for estimating class abundance from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **144**: 265-283.

Menon, P., Becquevort, S., Billen, G. & Servais, P. (1996) Kinetics of flagellate grazing in the presence of two types of bacterial prey. *Microb. Ecol.* **31**: 89-101.

Micha, J. C. & Pilette, (1988) L'impact de l'homme sur l'écosystème Meuse. Ed. Presses universitaires de Namur, 140p.

Monfort, P., Ratinaud, M. H., Got, P. & Baleux, B. (1995) Apports de la cytométrie en flux et en image en écologie bactérienne des milieux aquatiques. *Océanis.* **21** : 97-111.

Monger, B. C. & Landry, M. R. (1992) Size-selective grazing by heterotrophic nanoflagellates: an analysis using live-stained bacteria and dual-beam flow cytometry. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **37**: 173-185.

Moriarty, D. G. W. (1975) A method for estimating the biomass of bacteria in aquatic sediments and its application to trophic studies. *Oecologia.* **20**: 219-229.

Morris, I., Yentsch, C. M. & Yentsch, C. S. (1971) Relationship between light carbon dioxide fixation and dark carbon dioxide fixation by marine algae. *Limnol. Oceanogr.* **16**: 854-858.

Ooms-Wilms, A. L., Postema, G. & Gulati, R. D. (1995) Evaluation of bacterivory of Rotifera based on measurements of *in situ* ingestion of fluorescent particles, including some comparisons with Cladocera. *J. Plankton Res.* **17** (5): 1057-1077.

Ooms-Wilms, A. L. (1997) Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes? *J. Plankton Res.* **19**: 1125-1141.

Péchar, L. (1987) The use of acetone: methanol mixture for extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll *a* in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **78**, 1, *Algol Stud.* **46**, 588p.

Porter, K. G. (1988) Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiol.* **159**: 89-97.

Porter, K. G. & Feig, Y. S. (1980) Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.

Pourriot, R. (1977) Food and feeding habits of rotifera. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **8**: 243-260.

Reynolds, C. S. & Descy, J.-P. (1996) The production, biomass and structure of phytoplankton in large rivers. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **113**: 161-187.

Roszak, D. B. & Colwell, R. R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365-379.

Sanders, P., Porter, K. G., Bennett, S. J. & De Biase, A. E. (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 673-687.

Sell, A. F. & Overbeck, J. (1992) Exudates: phytoplankton-bacterioplankton interactions in Plußsee. *J. Plankton Res.* **14**: 1199-1215.

Servais, P. (1989) Bacterioplankton biomass and production in the river Meuse (Belgium). *Hydrobiol.* **174**: 99-110.

Servais, P. (1987) Etude de la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes en rivière. Thèse de doctorat (première et deuxième partie) Université libre de Bruxelles 271p.

Servais, P., Becquevort, S. & Vandeveld, F. (1998) Comparaison de deux méthodes d'estimation du broutage des bactéries par les protozoaires en milieu aquatique. *Revue des sciences de l'eau.* **4**: 631-639.

Servais, P., Billen, G., Martinez, J. & Vives-Rego, J. (1989) Estimating bacterial mortality by the disappearance of ³H-labeled intracellular DNA. *FEMS Microb. Ecol.* **62**: 119-126.

Servais, P., Billen, G. & Vives-Rego, J. (1985) Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1448-1454.

Servais, P. & Garnier, J. (1993) Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microbial Ecology.* **25**: 19-33.

Servais, P., Gosselain, V., Joaquim-Justo, C., Becquevort, S., Thomé, J.-P. & Descy, J.-P. (2000) Trophic relationships between planktonic microorganisms in the river Meuse (Belgium): a carbon budget. *Arch. Hydrobiol.* **149**: 625-653.

Servais, P. & Lavandier, P. (1995) Mesures de production bactérienne la incorporation de Thymidine et Leucine marquées: Discussion des protocoles expérimentaux et exemple d'application. *Oceanis* **21**: 161-189.

Servais, P., Vives-Rego, J. & Billen, G. (1992) Survival and mortality of bacteria in natural environments. *Plant. Microbial Biotech. Research series.* **2**: 100-119.

Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Albright, L. J. (1987a) Bacteria: sink or link. *Nature* **235**: 88-89.

Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Fallon, R. D. (1987b) Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 958-965.

Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Rassoulzadegan, F. (1988) Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: Temperature dependence. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1091-1095.

Somville, M. & Billen, G. (1983) A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 190-193.

Somville, M. (1984) Measurement and study of substrates specificity of exoglucosidase activity in eutrophic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1181-1185.

Starkweather, P. L., Gilbert, J. J. & Frost, T. M. (1979) Bacterial feeding by the rotifers. *Brachionus calyciflorus*: clearance and ingestion rates, behavior and population dynamics. *Oecologia* **44**: 26-30.

Steele, J. H. (1974) Spatial heterogeneity and population stability. *Nature* **248**: 83.

Stone, L. (1990) Phytoplankton-bacteria-protozoa interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **64**: 131-138.

Sundh, I. & Bell, R. T. (1992) Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiol.* **229**: 93-106.

Transvik, L. J. (1989) Bacterioplankton growth, grazing mortality and quantitative relationships to primary production in a humic and clear water lake. *J. Plankton Res.* **11**: 988-1000.

Vanderploeg, H. A. (1990) Zooplankton particle selection and feeding mechanisms. In: *The biology of particles in aquatic systems*. R. S. Wotton (ed.), CRC Press, Boca Raton, p.183-212.

Vandeveld, F. (1996) Etude des relations trophiques au sein du plancton en milieu fluvial (exemple de la Meuse dans son cours Belge). Mémoire de Licence ULB, 64p.

Van Wambeke, F. (1995) Numération et taille des bactéries planctoniques au moyen de l'analyse d'images couplée à l'épifluorescence. *Océanis*. **21** : 113-124.

Viroux, L. (2000) Dynamique du métazooplancton en milieu fluvial. Thèse de doctorat, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 309p.

Viroux, L. (1997) Zooplankton development in two large lowland rivers, the Moselle (France) and the Meuse (Belgium), in 1993. *Journal of Plankton Research*. Vol.19 n°**11**: 1743-1762.

Vrba, J., Simek, K., Nedoma, J. & Hartman, P. (1993) 4-Methylumbelliferone-• -N-acetylglucosaminide hydrolysis by a High-Affinity Enzyme, a putative marker of protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3091-3101.

Watson, S. W., Novitsky, T. J., Quinby, H. L. & Valois, S. W. (1977) Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 940-946.

Wetzel, R. G. (1983) Limnology (Second edition), Saunders College Publishing, 858p.

Williams, P. J. LeB. (1981) Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* **5**: 1-28.

ANNEXES

Physico-chimie à Tailfer en 2001

Date	Température (°C)	O ₂ (mg/l)	pH	k (m ⁻¹)	Alcalinité (mgC/l)	Si (mg/l)	NH ₄ ⁺ (µg N/l)	NO ₂ ⁻ (µg N/l)	NO ₃ ⁻ (mg N/l)	SRP (µg P/l)
7-mai	12	12,3	8,3	-	-	1,0	53,2	8,1	1,8	10,2
14-mai	16,1	13,3	8,4	1,50	35,91	0,7	54,2	12,0	1,6	148,6
21-mai	14,8	13,6	8,42	1,59	36,16	2,4	50,2	6,2	1,8	48,3
28-mai	18,7	12,1	8,33	1,43	37,13	2,9	45,3	7,3	1,6	7,8
5-juin	17,1	11,8	8,27	2,03	37,04	3,8	66,0	10,4	1,5	30,9
11-juin	16,2	11,3	8,32	1,83	38,48	4,4	44,3	12,0	1,5	211,6
18-juin	17,3	9,5	8,1	-	-	2,6	66,0	15,4	1,8	106,8
25-juin	18,4	10,3	8,18	1,85	34,85	1,8	44,3	14,3	1,4	80,3
3-juil	21,1	10,8	8,4	2,12	34,23	1,9	52,2	16,5	1,0	22,7

Abondances planctoniques (ind./l.) à Tailfer en 2001

	bactéries	flagellés	ciliés	sarcodines	Protozoaires (10e6ind/l)	Zooplankton
7-mai	1,94E+10	1621025	27475	0	1,65	9
14-mai	1,44E+10	3077200	82425	0	3,16	12
21-mai	1,83E+10	3318980	170345	0	3,49	18
28-mai	1,63E+10	1813350	247275	0	2,06	91
4-juin	1,55E+10	1758400	41212,5	164850	1,96	-
11-juin	2,18E+10	2527700	247275	54950	2,83	209
18-juin	2,34E+10	3379425	192325	631925	4,20	74
25-juin	1,04E+10	2774975	109900	82425	2,97	7
3-juil	1,29E+10	3351950	164850	357175	3,87	145

Production bactérienne à Tailfer en 2001.

	DPM	nmole/L.h.	gC/l.h.
7-mai	415725,2	0,44	5,84
7-mai	458478,7	0,48	6,44
7-mai	465075,0	0,49	6,53
14-mai	227146,8	0,24	3,19
14-mai	266323,0	0,28	3,74
14-mai	246875,0	0,26	3,47
21-mai	323495,5	0,34	4,54
21-mai	289054,8	0,31	4,06
21-mai	106504,1	0,11	1,50
28-mai	494566,6	0,00	0,00
28-mai	145253,0	0,15	2,04
28-mai	140132,1	0,15	1,97
5-juin	332150,1	0,35	4,66
5-juin	319564,7	0,34	4,49
5-juin	368143,6	0,39	5,17
11-juin	450024,1	0,48	6,32
11-juin	446517,2	0,47	6,27
11-juin	448697,3	0,47	6,30
18-juin	415270,6	0,44	5,83
18-juin	400984,6	0,42	5,63
18-juin	409587,5	0,43	5,75
25-juin	894332,7	0,00	0,00
25-juin	521629,2	0,55	7,32
25-juin	570867,3	0,60	8,02
3-juil	639044,6	0,68	8,97
3-juil	685095,2	0,72	9,62
3-juil	650004,6	0,69	9,13

Taux de mortalité bactérienne (par heure) à Tailfer en 2001

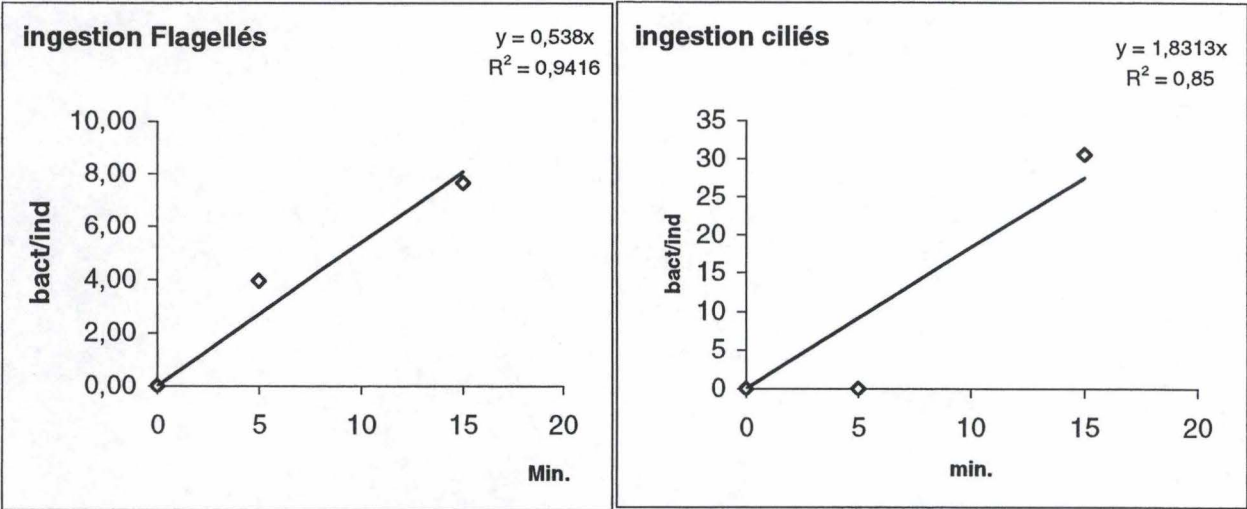
	grazing total	grazing protozoaires	grazing métazoaires	lyse bactérienne	Mortalité totale
7-mai	0,009	0,0067	0,0023	0,0000	0,009
14-mai	0,0179	0,0077	0,0102	0,0148	0,0327
21-mai	0,0077	0,0077	0,0000	0,0000	0,0077
28-mai	0,0115	0,011	0,0005	0,0000	0,0115
4-juin	0,0063	0,0037	0,0026	0,0000	0,0063
11-juin	0,0102	0,0093	0,0009	0,0000	0,0102
18-juin	0,0156	0,0156	0,0000	0,0000	0,0156
25-juin	0,0081	0,0081	0,0000	0,0071	0,0152
2-juil	0,0077	0,0077	0,0000	0,0000	0,0077

Ingestion de bactéries par les différents types de protozoaires (bact/l.h.) à Tailfer en 2001.

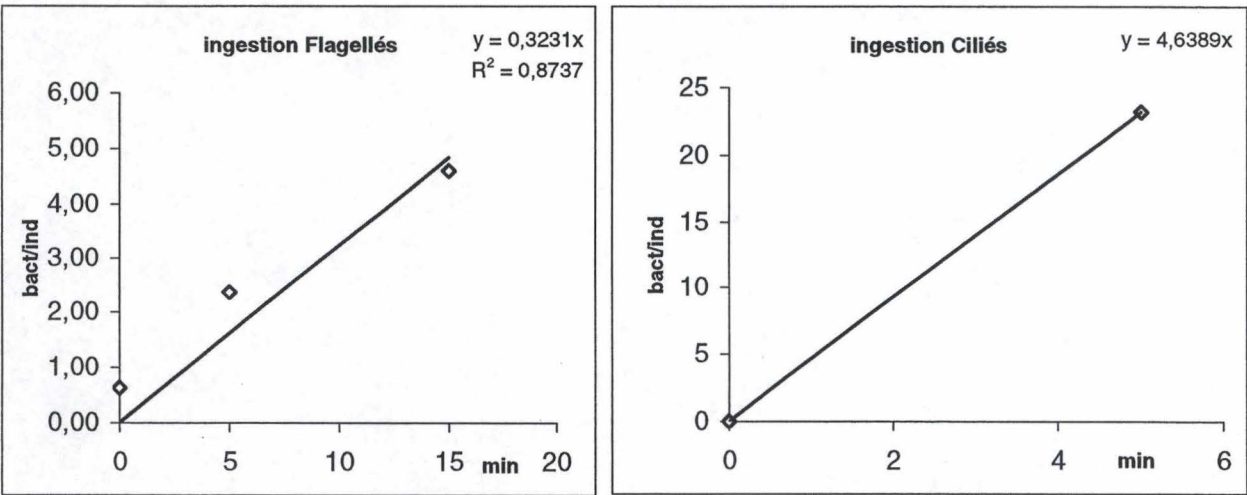
	Flagellés mixotrophes	Flagellés hétérotrophes	Ciliés mixotrophes	Ciliés hétérotrophes
7-mai	7475241	44851446	3018898	0
14-mai	16703288	42951311	10196302	12745378
21-mai	14501768	78954071	1336507	1188006
28-mai	11610427	81272987	1575906	24426544
4-juin	20985518	86565260	425863	1490519
11-juin	10007103	21553760	2832712	3776949
18-juin	22246795	119790437	453806	1701773
25-juin	24071578	63789681	345984	790821
3-juil	2968487	39909657	302445	1058557

Ingestion de bactéries par les protozoaires suivant la méthode FLB:

Campagne du 7 mai 2001:

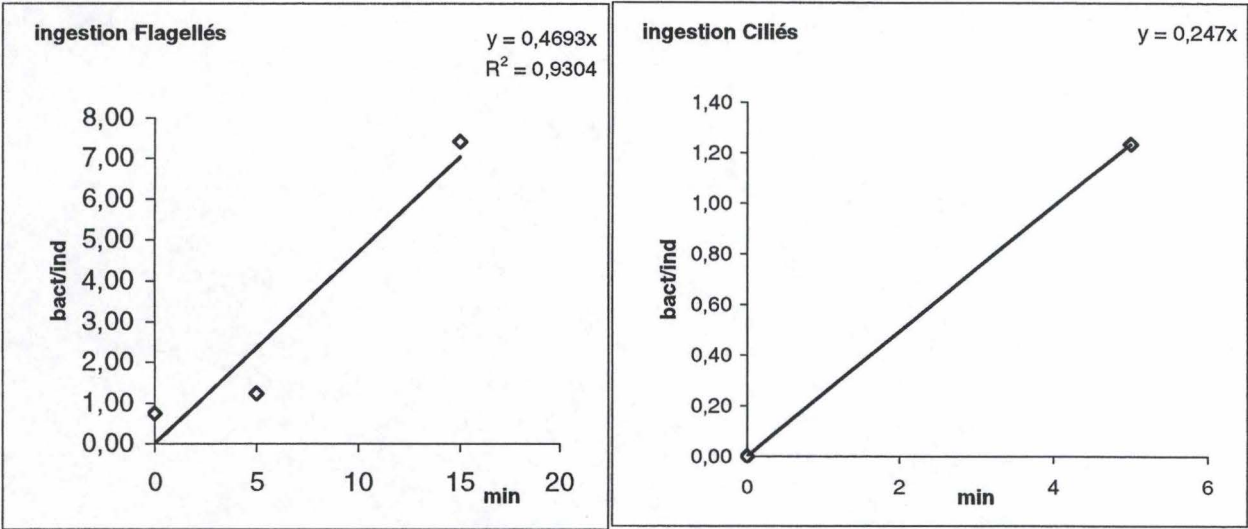


Campagne du 14 mai 2001:

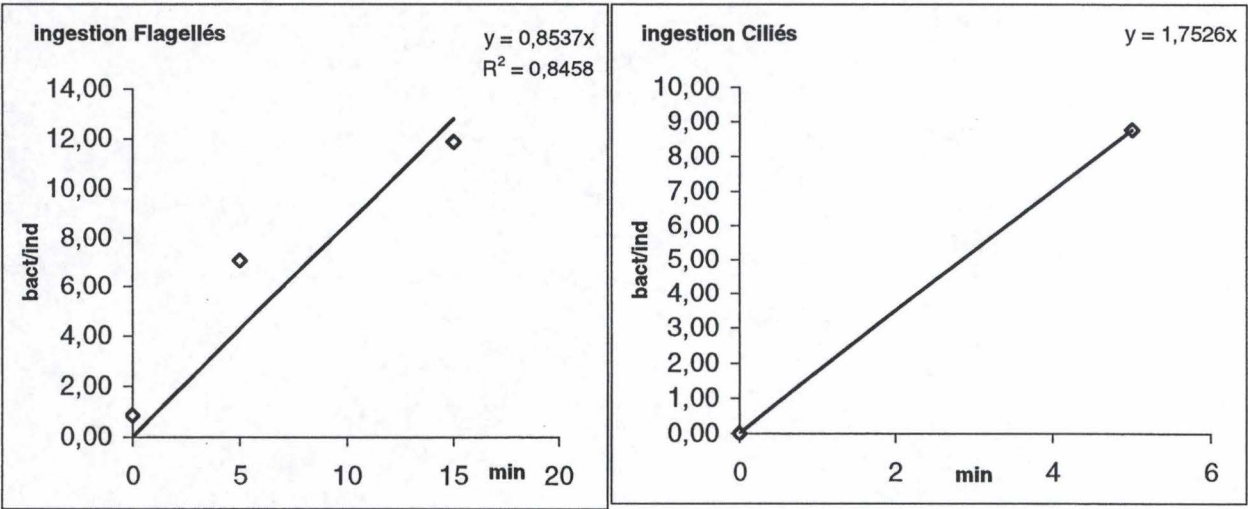


Ingestion de bactéries par les protozoaires suivant la méthode FLB:

Campagne du 21 mai 2001:

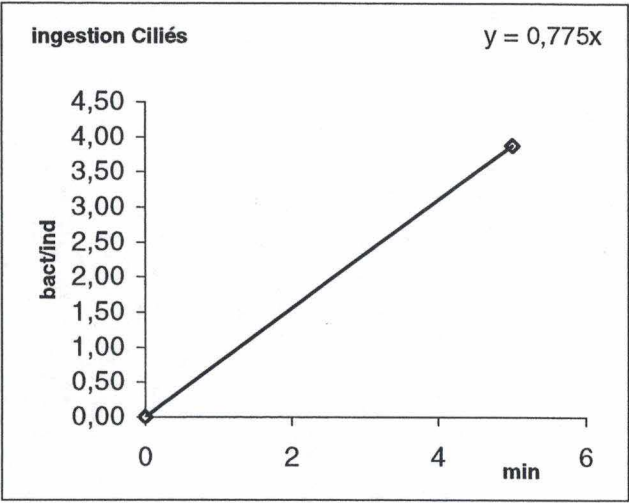
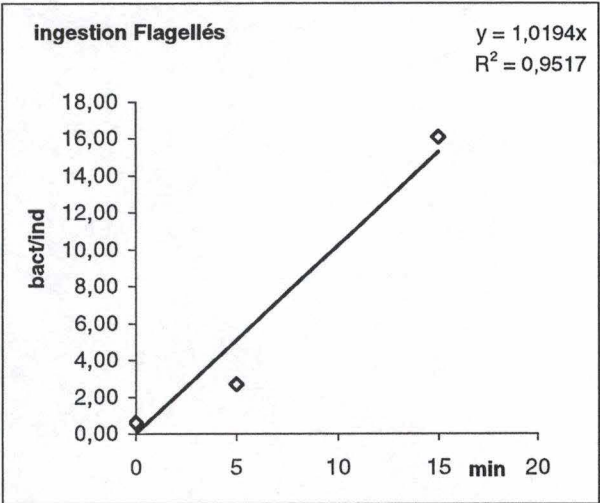


Campagne du 28 mai 2001:

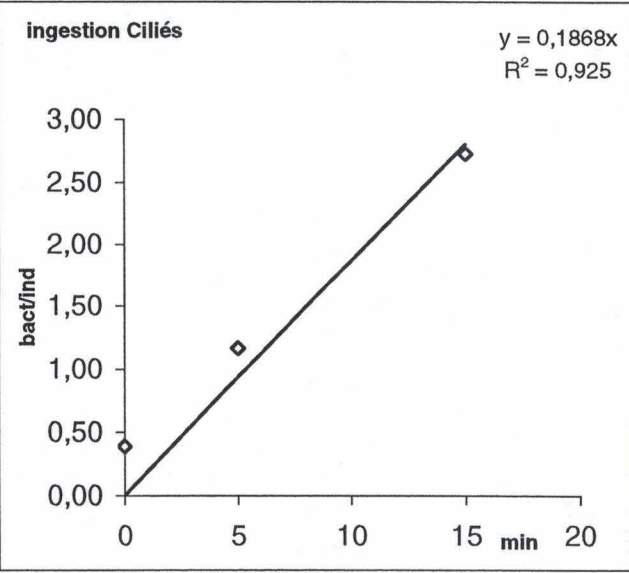
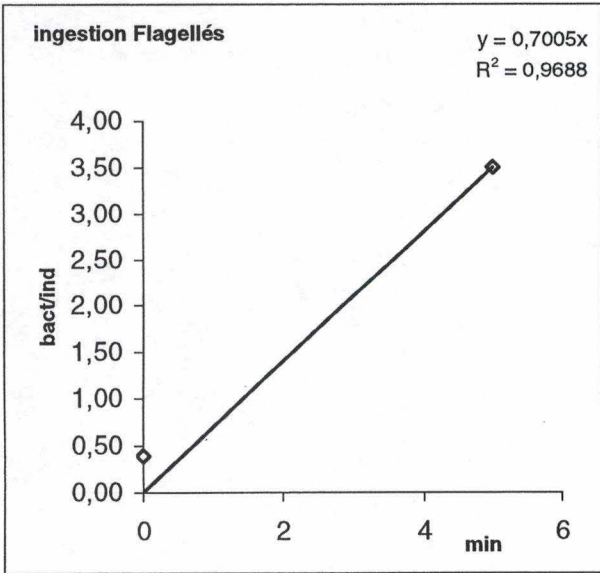


Ingestion de bactéries par les protozoaires suivant la méthode FLB:

Campagne du 4 juin 2001:

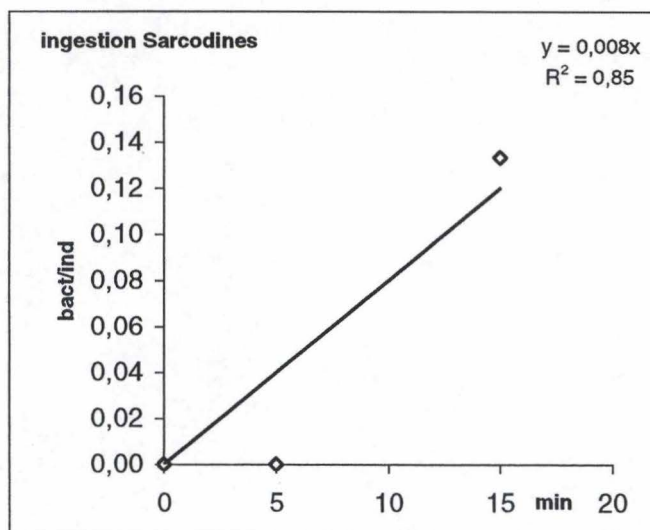
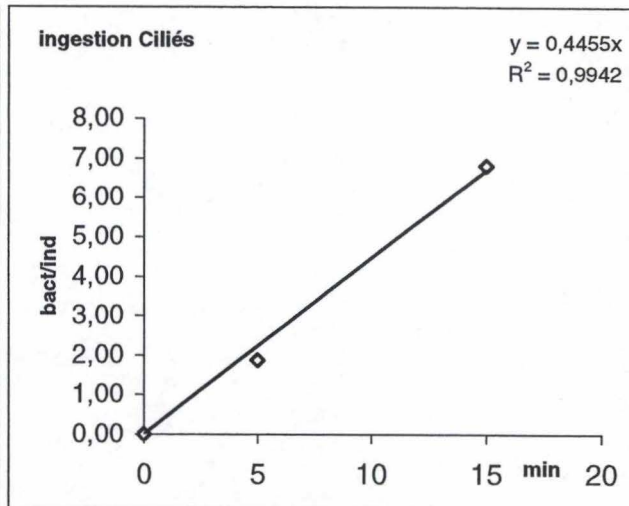
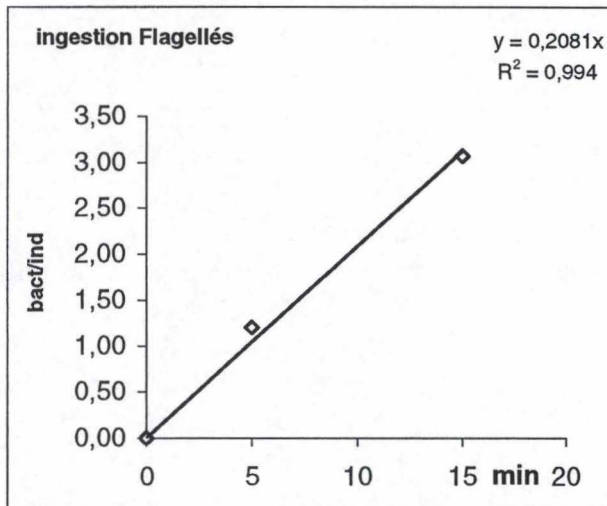


Campagne du 18 juin 2001:



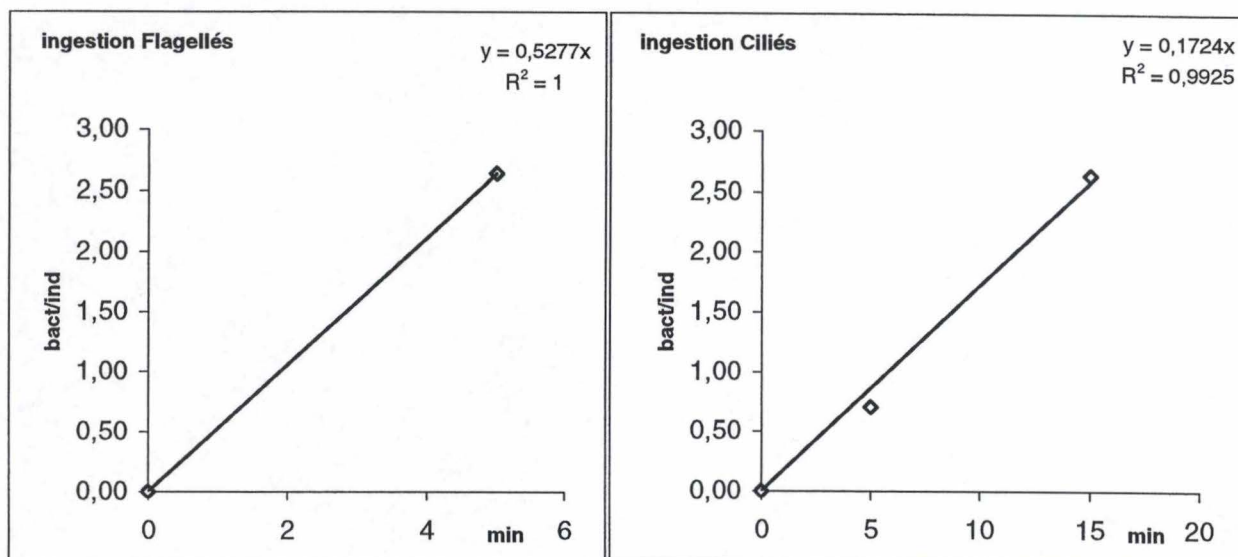
Ingestion de bactéries par les protozoaires suivant la méthode FLB:

Campagne du 11 juin 2001:

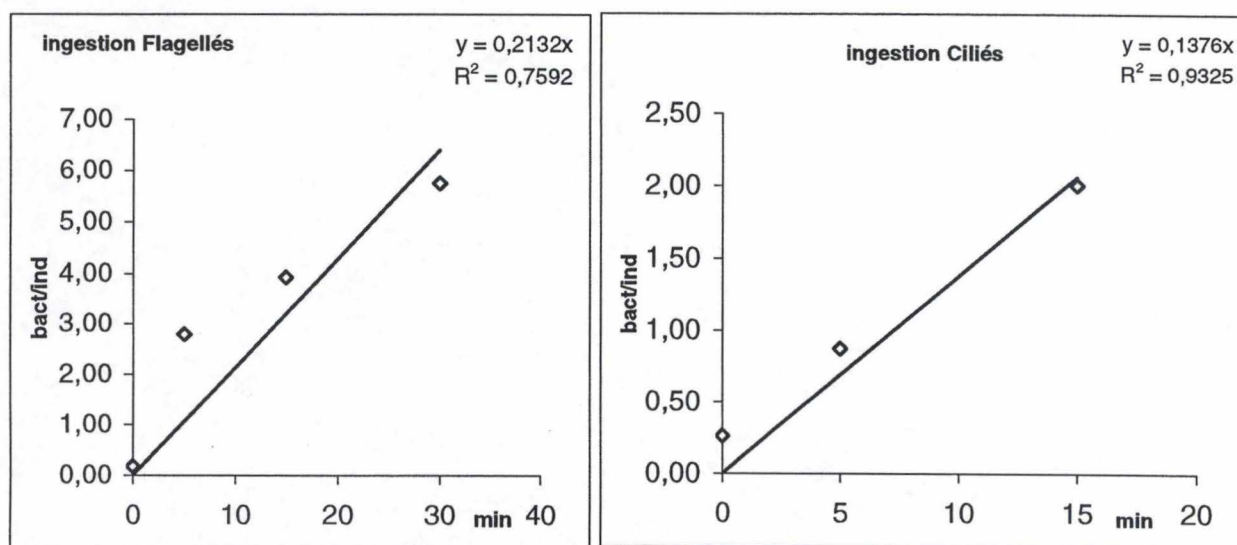


Ingestion de bactéries par les protozoaires suivant la méthode FLB:

Campagne du 25 juin 2001:



Campagne du 3 juillet 2001:





1



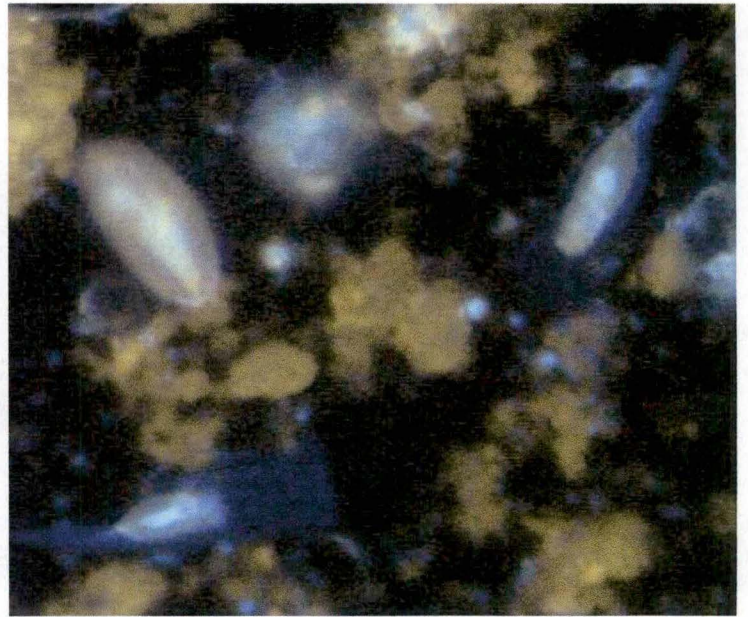
2



3



4



5

Ciliés en épifluorescence (1-5)



6



7

Flagellés en épifluorescence (6-7)